



Liliana Vieira Costa

**Estudo da Influência do Oxigénio na Produção de
Bioetanol**



Liliana Vieira Costa

Estudo da Influência do Oxigénio na Produção de Bioetanol

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do Mestrado Integrado em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Luísa Alexandra Seuanes Serafim Leal, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

O Júri

Presidente

Doutor Carlos Manuel Santos Silva
Professor Auxiliar do Departamento de Química, Universidade de Aveiro

Doutor António Luís Pereira do Amaral
Professor Adjunto do Departamento de Engenharia Química e Biológica, Instituto Superior de Engenharia de Coimbra

Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier
Professora Auxiliar do Departamento de Química, Universidade de Aveiro

Doutora Luísa Alexandra Seuanez Serafim Leal
Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Química, Universidade de Aveiro

Agradecimentos

À Professora Doutora Ana Xavier e Professora Doutora Luísa Serafim agradeço todo o apoio e orientação durante este trabalho.

Ao Prof. Carlos Silva por ter disponibilizado os equipamentos do seu laboratório para que assim fosse possível a realização de alguns dos ensaios experimentais efectuados neste estudo.

À Doutora Patrícia Lito pela ajuda prestada na realização destes ensaios.

Aos amigos e colegas de laboratório Susana, Daniel e Dora, agradeço a amizade, ajuda e paciência durante todo o trabalho.

Aos meus queridos amigos, Ana Conceição, Joana Candeias, Joana Mendes, Juliana Pereira, Pedro Garrett, Pedro Oliveira e Susana Leite por toda a amizade e apoio incansáveis. Obrigado por fazerem parte da minha vida.

Aos meus pais, obrigado por todo o carinho, amor e paciência que sempre tiveram comigo. Nada disto seria possível sem a vossa ajuda e apoio.

Palavras-chave

Bioetanol, Licor de cozimento ao sulfito ácido, Xilose, Fermentação, *Pichia stipitis*, Taxa de transferência de oxigénio, Coeficiente volumétrico de transferência de massa, Taxa de consumo de oxigénio.

Resumo

O objectivo deste trabalho foi o estudo da influência de arejamento na produção de etanol a partir do licor de cozimento ao sulfito ácido (HSSL). O HSSL é rico em açúcares, xilose e glucose que podem ser utilizados como substrato por *Pichia stipitis*, um microrganismo utilizador de hexoses e pentoses, para a produção de etanol.

Na primeira parte do trabalho estudou-se a transferência de massa do oxigénio para o meio reaccional escolhido, na ausência do microrganismo. Calculou-se o coeficiente volumétrico de transferência de massa, k_La e a taxa de transferência de oxigénio, OTR , pelo método estático da desgaseificação. Foi fornecida ao sistema uma mistura de gases (ar comprimido e azoto) variando-se as proporções relativas de ambos os gases, bem como o caudal total de gás fornecido ao reactor e a velocidade de agitação.

Na segunda parte do trabalho realizaram-se os ensaios com o microrganismo utilizando um bio-reactor em descontínuo. Foi então possível determinar, além do k_La e da OTR , a taxa de consumo de oxigénio, OUR , pelo método dinâmico. Monitorizou-se o consumo de substrato e produção de etanol por *P. stipitis* através de análises periódicas em HPLC. Os melhores resultados foram obtidos para o ensaio que continha uma proporção de 8.40% de O_2 e 91.6% de N_2 em 100 mL/min (Fermentação III), obtendo-se uma concentração máxima de etanol produzido de 2.44 g.L^{-1} . O rendimento de produção de etanol foi de 0.27 g.g^{-1} em 48 horas de fermentação com um k_La de 6.67 h^{-1} e uma taxa específica de consumo de oxigénio, q_{O_2} , de $0.39 \text{ mmolO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Keywords

Bioethanol, Hardwood Spent Sulfite Liquor, Xylose, Fermentation, *Pichia stipitis*, Oxygen Transfer Rate, Volumetric Mass Transfer Coefficient, Oxygen Uptake Rate.

Abstract

The aim of this work was the study of the influence of the oxygen supply on the production of ethanol from Hardwood Spent Sulfite Liquor (HSSL), a substrate rich in xylose by the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. The present study aimed to evaluate the influence of agitation and aeration conditions on ethanol production by *P. stipitis*.

In the first part of this work the study of the oxygen mass transfer was performed in the absence of microorganisms. The volumetric mass transfer coefficient, k_La and the oxygen transfer rate, OTR , were calculated using the static gassing out method.

In the second part of this work several biological assays were performed in a batch reactor. A mixture of gases (air and nitrogen) was supplied to the system and the effects of the proportion of the gases, the total volumetric flow of the gas and the stirring speed were studied. It was possible to calculate k_La , OTR and the oxygen uptake rate, OUR , by the dynamic in situ method. The consumption of substrate and production of ethanol by *P. stipitis* was monitored through periodic analysis by high-performance liquid chromatography, HPLC. The best results were achieved for the fermentation that contained a proportion of 8.40% O_2 and 91.6% N_2 in 100 mL/min (Fermentation III), yielding a maximum ethanol concentration of 2.44 g.L⁻¹. The yield of ethanol production was 0.27 g.g⁻¹ in 47 hours of fermentation with a k_La of 6.67 h⁻¹ and a specific oxygen uptake rate, qO_2 , of 0.39 mmolO₂g⁻¹h⁻¹.

Índice

Índice.....	I
Índice de Figuras	III
Índice de Tabelas.....	V
Nomenclatura	VII
1 Introdução	1
2 Revisão bibliográfica.....	3
2.1 Biocombustíveis.....	3
2.2 Bioetanol	4
2.3 Processo de cozimento ao sulfito ácido.....	5
2.3.1 Licor de cozimento ao sulfito ácido (HSSL).....	6
2.4 Crescimento microbiano	7
2.5 <i>Pichia stipitis</i>	9
2.6 Produção biológica de etanol	10
2.7 Controlo do fornecimento de oxigénio em sistemas industriais.....	12
2.8 Transferência de massa em bio-reactores.....	13
2.8.1 Transferência de massa gás-líquido	13
2.8.1.1 Teoria dos dois filmes	15
2.8.1.2 Teoria da penetração de Higbie.....	17
2.9 Transferência de oxigénio num processo microbiano.....	19
2.9.1 Factores que influenciam a taxa de transferência de oxigénio	19
2.9.2 Coeficiente volumétrico de transferência de massa, k_La	19
2.9.3 Métodos usados na determinação do coeficiente volumétrico de transferência de massa, k_La	20
2.9.3.1 Método estático da degaseificação	20
2.9.3.2 Método dinâmico (<i>in situ</i>).....	21
2.10 Taxa de consumo de oxigénio.....	23
3 Materiais e Métodos	25
3.1 Microrganismos.....	25
3.2 Meios de cultura.....	25
3.2.1 Meio YM (<i>yeast medium</i>)	25
3.2.2 Meio MS (<i>meio suplementar</i>).....	25
3.2.3 Licor de cozimento ao sulfito ácido:	26
3.2.3.1 Pré-tratamento químico do HSSL:	26

3.2.3.2	Tratamento biológico do HSSL com <i>Paecilomyces variotti</i> :	27
3.3	Estudo da transferência de oxigénio na ausência de <i>P. stipitis</i>	27
3.3.1.1	Ensaio em água	28
3.3.1.2	Ensaio em HSSL	28
3.4	Estudo da transferência de oxigénio em fermentações de <i>P. stipitis</i>	28
3.4.1	Preparação de pré-inóculos e inóculos	28
3.4.2	Ensaio biológico	29
3.5	Determinação da concentração de biomassa	29
3.5.1	Método gravimétrico	30
3.5.2	Método turbidimétrico	30
3.6	Determinação da concentração de substratos e produto através de HPLC	30
4	Resultados	31
4.1	Estudo da transferência de oxigénio	31
4.1.1	Estudo da transferência de oxigénio em água	31
4.1.2	Estudo da transferência de oxigénio em HSSL	35
4.1.3	Ensaio Biológico	38
4.1.3.1	Estudo da transferência de oxigénio em fermentações de <i>P. stipitis</i>	38
4.1.3.2	Fermentação I	39
4.1.3.3	Fermentação II	40
4.1.3.4	Fermentação III	41
4.1.3.5	Fermentação IV	43
5	Conclusões	47
6	Bibliografia	49
7	ANEXOS	55
7.1	ANEXO 1 – Curvas de Calibração	55

Índice de Figuras

Figura 2.1 Produção de Etanol	4
Figura 2.2 Esquema de produção da pasta de papel e formação do licor ao sulfito ácido.	5
Figura 2.3 Curva de crescimento de uma população microbiana.....	7
Figura 2.4 <i>Pichia stipitis</i>	9
Figura 2.5 Esquema da fermentação alcoólica por leveduras.	10
Figura 2.6 Esquema da degradação da xilose com a formação de ácido pirúvico com posterior formação de etanol.	11
Figura 2.7 Fenómeno de transferência de massa que ocorre durante o transporte de oxigénio da fase gasosa para a célula num reactor biológico.....	14
Figura 2.8 Representação gráfica da teoria dos dois filmes.	15
Figura 2.9 Representação da teoria da penetração.	17
Figura 2.10 Representação gráfica da concentração de oxigénio dissolvido em função do tempo.	20
Figura 2.11 Representação gráfica de $\ln ((C^* - C_L)/(C^*))$ em função do tempo.	21
Figura 2.12 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de massa pelo método dinâmico.	22
Figura 4.1 Variação dos valores de k_La em função da percentagem de oxigénio presente em cada ensaio experimental e para cada um dos caudais e velocidades de rotação testadas.....	32
Figura 4.2 Variação dos valores de OTR em função da percentagem de oxigénio presente em cada ensaio experimental e para cada um dos caudais e velocidades de rotação testadas.....	33
Figura 4.3 Variação dos valores de k_La em função da percentagem de oxigénio presente em cada ensaio experimental e para cada um dos caudais e velocidades de rotação testadas.....	36
Figura 4.4 Variação dos valores de OTR em função da percentagem de oxigénio presente em cada ensaio experimental e para cada um dos caudais e velocidades de rotação testadas.....	37
Figura 4.5 Evolução do perfil de concentrações de xilose, glucose, ácido acético, etanol, biomassa e pH durante a fermentação I.	39
Figura 4.6 Evolução do perfil de concentrações de xilose, glucose, ácido acético, etanol, biomassa e pH durante a fermentação II.	40
Figura 4.7 Evolução do perfil de concentrações de xilose, glucose, ácido acético, etanol, biomassa e pH durante a fermentação III.	42
Figura 4.8 Evolução do perfil de concentrações de xilose, glucose, ácido acético, etanol, biomassa e pH durante a fermentação IV.	43
Figura 7.1 Curva de calibração obtida entre o peso seco e a densidade óptica a 650nm de <i>P. stipitis</i>	55
Figura 7.2 Curva de calibração da glucose (HPLC).....	55

Figura 7.3 Curva de calibração da xilose (HPLC)	56
Figura 7.4 Curva de calibração do ácido acético (HPLC).....	56
Figura 7.5 Curva de calibração do etanol (HPLC).....	57

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Composição química do licor de cozimento ao sulfito ácido.....	6
Tabela 2 - Composição do meio YM.	25
Tabela 3 - Composição do meio MS.....	26
Tabela 4 - Valores de k_{La} e OTR obtidos para a água a 29 °C.	31
Tabela 5 – Concentração de saturação de Oxigénio e Azoto teóricos e Concentração de oxigénio obtida experimentalmente.	34
Tabela 6 - Valores de k_{La} , OTR e $C_{exp}^*(O_2)$ obtidos em HSSL A 29 °C.....	36
Tabela 7 - Valores de OTR , OUR , k_{La} e qO_2 obtidos para as fermentações.....	38
Tabela 8 - Tabela resumo das fermentações.	44

Nomenclatura

$\frac{dC_c}{dz}$	Gradiente de Concentração ao Longo da Espessura do Filme	$\text{mol.m}^{-3}\text{m}^{-1}$
$C_{O_2}^*$	Concentração de Saturação de Oxigénio Dissolvido	$\text{mmolO}_2.\text{L}^{-1}$
C_L	Concentração de Oxigénio Dissolvido no Seio do Líquido	$\text{mmolO}_2.\text{L}^{-1}$
q_{O_2}	Taxa Específica de Consumo de Oxigénio	$\text{mmolO}_2.\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$
ϕ	Distribuição de Tempos de Contacto	
\dot{Q}_c	Caudal Molar por Volume de Líquido	$\text{mol.m}^{-3}\text{s}^{-1}$
μ	Taxa Específica de Crescimento	h^{-1}
a	Área Específica para a Transferência de Massa	$\text{cm}^2.\text{cm}^{-3}$
$C_{exp}^*(O_2)$	Concentração de Saturação de Oxigénio Obtida Experimentalmente	$\text{mmolO}_2.\text{L}^{-1}$
$C_{teo}^*(N_2)$	Concentração Teórica de Saturação de Azoto Dissolvido	$\text{mmolN}_2.\text{L}^{-1}$
$C_{teo}^*(O_2)$	Concentração Teórica de Saturação de Oxigénio Dissolvido	$\text{mmolO}_2.\text{L}^{-1}$
C_A	Concentração da Espécie A	mol.m^{-3}
$C_{G,c}$	Concentração do componente c na Bolha de Gás	mol.m^{-3}
$C_{Gi,c}$	Concentração do componente c na Bolha de Gás na interface	mol.m^{-3}
$C_{L,c}$	Concentração do componente c no Seio do Líquido	mol.m^{-3}
$C_{Li,c}$	Concentração do componente c no Seio do Líquido na interface	mol.m^{-3}
D_{AB}	Coefficiente de difusão entre A e B	$\text{m}^2.\text{s}^{-1}$
D_c	Coefficiente de Difusão Molecular do Componente c	$\text{m}^2.\text{s}^{-1}$
H_c	Constante de Henry do componente c	$\text{mol.atm}^{-1}\text{L}^{-1}$
J_c	Fluxo Molar do Componente c	$\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$
k_G	Coefficiente de Transferência de Massa no Filme de Gás	m.s^{-1}
k_L	Coefficiente de Transferência de Massa no Seio do Líquido	m.s^{-1}
K_L	Coefficiente Global de Transferência de Massa	m.s^{-1}
k_La	Coefficiente Volumétrico de Transferência de massa	h^{-1}
OTR	Taxa de Transferência de Oxigénio	$\text{mmolO}_2.\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$
OUR	Taxa de Consumo de Oxigénio	$\text{mmolO}_2.\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$
p_g	Pressão parcial do Gás	atm
Q_{total}	Caudal Volumétrico Total de Gás	$\text{cm}^3.\text{min}^{-1}$
r_p	Taxa de Produção de Etanol	$\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$
r_s	Taxa de Consumo de Substrato	$\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$

r_x	Taxa de Produção de Biomassa	$\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$
t	Tempo	h
t_d	Tempo de Duplicação	h
X	Concentração de Biomassa	g.L^{-1}
x	Fracção Molar do Sóluto	
x_g	Fracção molar do Gás	
$Y_{(p/s)}$	Rendimento Produto/Substrato	$(\text{g}_{\text{et}}/\text{g}_{\text{sub}})$
$Y_{(p/x)}$	Rendimento Produto/Biomassa	$(\text{g}_{\text{et}}/\text{g}_{\text{bio}})$
$Y_{(x/s)}$	Rendimento Biomassa/Substrato	$(\text{g}_{\text{bio}}/\text{g}_{\text{sub}})$
z	Espessura do Filme	m

1 Introdução

A subida gradual do preço do crude ocorrida nos últimos anos juntamente com as preocupações ambientais tem conduzido a um aumento de procura de energias renováveis. Uma das soluções propostas é produzir etanol a partir de biomassa vegetal. ^[1] Em alguns países como Estados Unidos ou Brasil a produção de bioetanol faz-se a partir de matéria-prima vegetal normalmente destinada à alimentação, tal como a cana-de-açúcar, beterraba, o milho e a cevada considerando-se por isso um biocombustível de 1ª geração. No entanto, a situação ideal é a produção de etanol a partir de subprodutos e resíduos industriais, biocombustíveis de 2ª geração, como da indústria papeleira que são ricos em materiais lenhocelulósicos. ^[2]

A matéria-prima mais abundante na Terra é a biomassa lenhocelulósica, constituída por celulose, hemicelulose e lenhina. A celulose é um polímero linear de unidades de glucose ligadas por ligações do tipo β -1-4 e corresponde a 35-50% do peso seco da biomassa lenhocelulósica. As hemiceluloses, ao contrário da celulose são polímeros heterogéneos compostos por pentoses nomeadamente xilose e arabinose e hexoses como a glucose, galactose e a manose. ^[3]

Um dos microrganismos mais eficientes a utilizar os açúcares presentes na biomassa lenhocelulósica para a produção de etanol é a levedura *Pichia stipitis*. A *P. stipitis* apresenta potencial para utilização a nível industrial, uma vez que consegue utilizar pentoses como a xilose como fonte de carbono e produz uma elevada quantidade de etanol, cerca de 41g/L. Além disso possui uma parede celular espessa e é bastante resistente às contaminações. ^[1]

A grande vantagem deste processo é o baixo custo que o substrato apresenta para a indústria tornando-se vantajoso no caso da obtenção de um rendimento de etanol elevado.

O objectivo deste trabalho é a produção de etanol a partir do licor de cozimento ao sulfito ácido, em condições de microarejamento, usando a levedura *P. stipitis*.

Para a realização deste trabalho, foi utilizado licor de cozimento ao sulfito ácido cedido pela indústria papeleira Caima, S.A. para servir como substrato para a produção de bioetanol por *P. stipitis*.

Na primeira parte do trabalho, estudou-se a transferência de massa de oxigénio para o meio reaccional escolhido sem células presentes. Calcularam-se o coeficiente volumétrico de transferência de massa, k_La e a taxa de transferência de oxigénio, OTR usando o método estático da desgaseificação.

Na segunda parte do trabalho, realizaram-se várias fermentações, usando um bio-reactor em descontinuo onde foram manipuladas algumas variáveis, tais como, caudais de ar, caudais de azoto e caudais volumétricos totais de forma a verificar a variação de k_La e de OTR , usando o

método estático da degaseificação. Foi também possível determinar o k_La , OTR , taxa de consumo de oxigénio, OUR , e taxa específica de consumo de oxigénio, qO_2 usando o método dinâmico (*in situ*) e o rendimento de etanol obtido no final.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Biocombustíveis

Biocombustíveis são combustíveis líquidos, sólidos ou gasosos de origem biológica não fóssil.

A fim de se reduzir a dependência mundial dos recursos não renováveis têm sido procuradas alternativas aos combustíveis derivados do petróleo.^[4] A união europeia estabeleceu que, até 2020 todos os países devem introduzir até 10% de biocombustíveis nos combustíveis fósseis usados para os transportes rodoviários.^[5] O uso de biocombustíveis oferece diversas vantagens, tais como: a diminuição de gases responsáveis pelo efeito de estufa, o facto de serem biodegradáveis e menos tóxicos, são obtidos a partir de matéria-prima renovável, consomem o CO₂ presente na atmosfera e podem ser misturados com combustíveis fósseis não sendo necessário alterar os motores dos veículos.^[6]

Os biocombustíveis podem ser considerados de primeira, segunda e terceira geração.

Os biocombustíveis de primeira geração são produzidos a partir de matéria-prima vegetal (soja, palma, colza, milho, girassol, cana-de-açúcar, etc.) geralmente destinada ao uso na cadeia alimentar humana e animal. A utilização intensiva desta matéria-prima contribuiu para um aumento mundial dos preços dos alimentos, resultando em distúrbios sociais em muitos países.^[7] A produção dos biocombustíveis de primeira geração está associada a impactos ambientais negativos como a erosão dos solos, a lixiviação de nutrientes, a diminuição da biodiversidade e alterações climáticas. Por todas as razões referidas anteriormente, a União Europeia incentiva a produção de biocombustíveis de segunda geração.

Os biocombustíveis de segunda geração são produzidos a partir de recursos renováveis que não competem com a cadeia alimentar humana e animal, tais como, resíduos agro-florestais e resíduos industriais.^[5, 8]

Os biocombustíveis de terceira geração são produzidos utilizando algas.

O biocombustível mais utilizado é o etanol, produzido em grande quantidade em países como o Brasil e os Estados Unidos. De modo a combater o aumento gradual dos preços do petróleo, a produção de etanol está a aumentar rapidamente como se observa pela Figura 2.1, sendo apoiada através de incentivos governamentais e regulamentações para a mistura de etanol com outros combustíveis.^[9]

Produção Mundial de Etanol

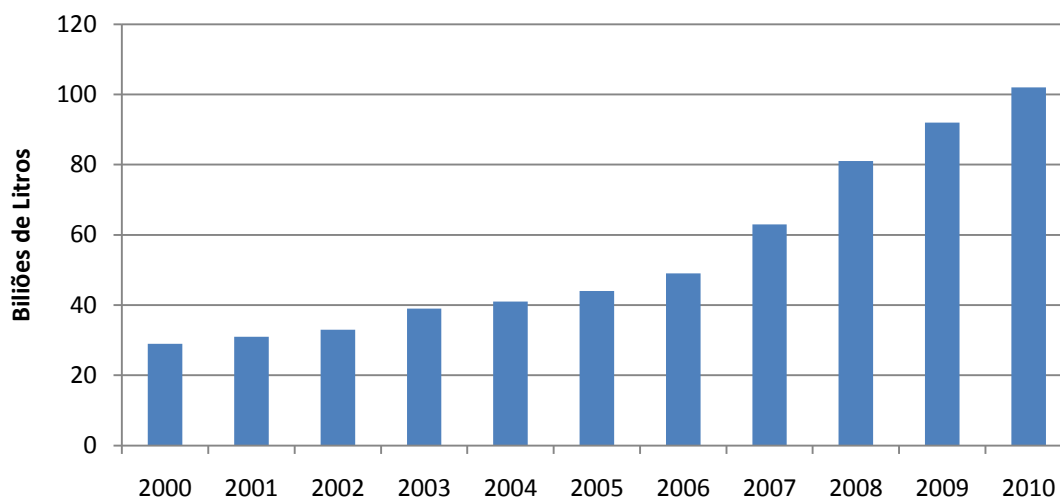


Figura 2.1 Produção de Etanol (Adaptado de *World Ethanol & Biofuels Report* ^[10])

2.2 Bioetanol

O bioetanol é um produto que pode ser obtido a partir de diferentes matérias-primas que contêm açúcares simples, amido ou substratos mais complexos como a biomassa celulósica. A biomassa celulósica é o recurso renovável mais abundante no planeta e está fora da cadeia alimentar humana, sendo por isso uma matéria-prima relativamente barata para a produção de etanol. ^[5]

A produção de bioetanol a partir de biomassa é uma das soluções para reduzir quer o consumo de crude, quer a poluição ambiental. ^[11]

O bioetanol é um dos biocombustíveis mais atraentes pois pode ser produzido em grande escala e misturado com gasolina ou usado puro. Além disso, o etanol contém um maior número de octanas, um limite máximo de inflamabilidade e uma velocidade de combustão superiores às da gasolina. Estas propriedades permitem uma maior taxa de compressão, ou seja, maior potência, menor tempo de combustão e uma combustão mais limpa fazendo do bioetanol uma alternativa viável ao uso da gasolina. ^[12-13] O uso do bioetanol conduz a uma redução nas emissões dos gases responsáveis pelo efeito de estufa, isto deve-se ao facto de o bioetanol ser um combustível oxigenado gerando assim menores quantidades de gases como o CO₂ e NO_x. ^[14-15]

Os principais passos para a produção de etanol a partir de biomassa celulósica são os seguintes: o pré-tratamento para tornar a celulose e a hemicelulose mais acessíveis para as etapas

seguintes, a hidrólise ácida ou enzimática para transformar os polissacarídeos em açúcares simples, a fermentação dos açúcares (pentoses e hexoses) em etanol com o auxílio de microrganismos e a separação e purificação do etanol. ^[14, 16-17]

2.3 Processo de cozimento ao sulfito ácido

O processo de cozimento, apresentado na Figura 2.2, inicia-se com a impregnação das aparas de madeira com o licor de cozimento. Durante este processo, as fibras da madeira são libertadas por deslenhificação através de tratamentos físicos e químicos. ^[18] A lenhina é solubilizada facilitando a sua separação da celulose através de tratamentos mecânicos suaves. Os dois tipos de tratamentos químicos mais comuns são o processo de cozimento ao sulfito e o processo de cozimento ao sulfato (kraft). ^[19]

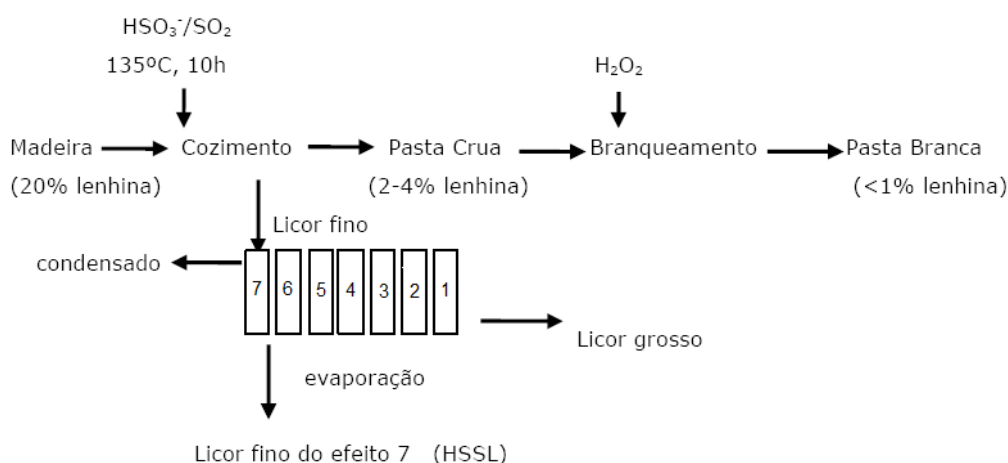
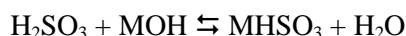
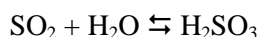


Figura 2.2 Esquema de produção da pasta de papel e formação do licor ao sulfito ácido. ^[20]

No processo ao sulfito, o cozimento da madeira faz-se usando uma mistura de dióxido de enxofre e ião bissulfito em equilíbrio. Devido à alta percentagem de dióxido de enxofre livre em solução o pH do meio é relativamente baixo, cerca de 1-2. O dióxido de enxofre é hidratado, originando ácido sulfuroso. ^[21] Este ácido é responsável pela ocorrência de reacções de condensação da lenhina, dificultando todo o processo de deslenhificação, assim sendo, é então necessário adicionar uma base para neutralizar o ácido formado durante o processo, aumentando assim o pH da solução. As bases mais usadas são o hidróxido de sódio, potássio, cálcio, amónia ou magnésio.

O equilíbrio químico pode ser descrito por:



Sendo $\text{M} = \text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}, \text{e } \text{NH}_4^+$. [22]

O processo tem uma duração de 4 a 10 horas e deve ocorrer a temperaturas entre 120 a 135 °C. Dos digestores sai pasta crua, que posteriormente é branqueada em dois estágios, e licor, que passa por uma série de sete evaporadores por onde flui em contra-corrente um condensado de vapores a temperatura elevada. Entra como licor fino no evaporador do efeito 7 e sai como licor grosso no evaporador de efeito 1. A maior parte do licor grosso é queimada para produzir energia e o restante é vendido. [23]

2.3.1 Licor de cozimento ao sulfito ácido (HSSL)

Como se referiu na secção anterior, o licor de cozimento ao sulfito ácido é um subproduto da indústria papelreira obtido no processo de produção de pasta de papel. [24] Este licor é queimado e o vapor gerado é aproveitado para mover turbinas produzindo-se energia suficiente para responder às necessidades da fábrica. É um resíduo muito importante, pois pode ser aproveitado para produzir produtos de alto valor acrescentado tais como: proteína microbiana, etanol, aldeídos aromáticos, polímeros, etc. [25-27] A composição química do licor de cozimento ao sulfito ácido, HSSL, apresenta-se na Tabela 1. [7]

Tabela 1 - Composição química do licor de cozimento ao sulfito ácido. [7]

Componentes	Concentração (gL ⁻¹)
Lenhosulfonatos	78,2 ± 0,6
Ácido Acético	8,2 ± 0,3
Furfural	< 0,1
Cinzas	19,8 ± 0,2
pH	3,4 ± 0,05
D-xilose	24,6 ± 0,5
D-manose	8,5 ± 0,9
L-arabinose	7,8 ± 0,3
D-galactose	4,5 ± 0,1
D-glucose	2,3 ± 0,1
L-ramnose	1,6 ± 0,3
L-fucose	0,4 ± 0,3

2.4 Crescimento microbiano

O crescimento microbiano é definido como o aumento do número de células numa população. Durante a divisão celular, uma célula divide-se em duas. A formação de duas células, a partir da célula mãe, é chamada de duplicação e o tempo requerido para que isto ocorra é denominado de tempo de duplicação, (t_d).^[28]

O crescimento microbiano em meio líquido num reactor pode ocorrer em diferentes modos de operação: contínuo, semi-contínuo ou descontínuo. O crescimento em descontínuo (*Batch*) requer o uso de um sistema fechado onde todos os nutrientes necessários à fermentação estão presentes no início, em um volume de meio fixo. As adições seguintes efectuadas ao sistema referem-se a ácidos e bases, para controlo de pH e gases para realizar o arejamento desejado.^[29]

Durante o processo em descontínuo, a população microbiana atravessa diversas fases de crescimento distintas: *lag*, exponencial, estacionária e morte, como se pode observar na Figura 2.3.

[28-29]

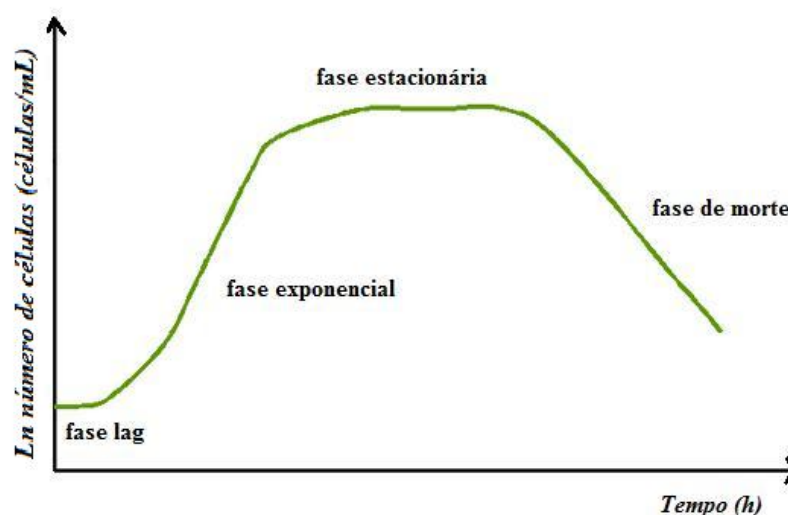


Figura 2.3 Curva de crescimento de uma população microbiana.

Quando uma população microbiana é inoculada num meio de cultura, o seu crescimento começa apenas após um período de tempo chamado de fase *lag*. Esta fase é um período de intensa actividade metabólica, onde o inóculo se adapta ao novo ambiente. Este intervalo de tempo pode ser curto ou longo, dependendo das condições de inóculo e das condições de crescimento.

Se uma cultura em crescimento exponencial é transferida para o mesmo meio sob as mesmas condições de crescimento, a fase *lag* pode ser reduzida ou até mesmo não existir e a fase exponencial começa imediatamente. Contudo, se o inóculo for retirado de uma cultura antiga (fase estacionária) e for transferido para o mesmo meio, existe normalmente um período de adaptação

necessário para que as células reponham os componentes essenciais para o crescimento. A fase *lag* é também observada quando as células sofrem traumas físicos (choque térmico e radiações) e químicos (por produtos tóxicos) ou quando são transferidas de um meio rico para outro de composição mais pobre. Os factores que afectam a fase *lag* são: a idade, a concentração, a viabilidade e morfologia do inóculo. ^[28-29]

Assim que as células se adaptam ao novo ambiente, entram na fase de aceleração ou fase exponencial. Durante o crescimento exponencial, cada célula divide-se para formar duas células, cada uma das quais também se divide para formar mais duas células e assim sucessivamente. Com o aumento da divisão celular é possível calcular a taxa específica de crescimento, (μ), esta pode ser descrita como o aumento da concentração de biomassa num determinado intervalo de tempo. Matematicamente este crescimento exponencial pode ser descrito pela Eq. 2.1.

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad \text{Eq. 2.1}$$

Integrando, vem que:

$$\frac{1}{x} dx = \mu dt \Leftrightarrow \int_0^x \frac{1}{x} dx = \int_0^t \mu dt \quad \text{Eq. 2.2}$$

Onde, x é a concentração de biomassa (g/L), μ é a taxa específica de crescimento e t é o tempo (h). ^[29]

Obtêm-se:

$$\ln x_t = \ln x_0 + \mu t \quad \text{Eq. 2.3}$$

Sendo que, x_t é a concentração da biomassa no tempo t e x_0 é a concentração da biomassa no início do crescimento exponencial.

O declive desta recta corresponde à taxa específica de crescimento, μ .

Considerando a situação de para um tempo zero, a biomassa celular corresponde a x_0 após um período fixo de crescimento exponencial equivalente a um tempo de duplicação t_d , a biomassa irá duplicar para $2x_0$, isto é, $x_t = 2x_0$ e $t = t_d$. ^[29]

Substituindo, obtêm-se:

$$\ln(2x_0) = \ln(x_0) + \mu t_d \quad \text{Eq. 2.4}$$

Desta forma, o tempo de duplicação (t_d) pode ser determinado através de:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \text{Eq. 2.5}$$

Contudo, o crescimento exponencial não ocorre indefinidamente, cessando devido à diminuição da disponibilidade de algum nutriente essencial no meio de cultura que se tornou limitante ou à produção de metabolitos secundários que se acumulam e atingem concentrações tóxicas para a célula apesar de ainda existir fonte de carbono disponível. Em qualquer dos casos, a taxa de crescimento reduz-se atingindo-se a fase estacionária, onde a concentração celular se mantém constante. Nesta fase, a velocidade de crescimento é nula, visto que o número de células que se formam iguala o número de células que morrem, embora a cultura continue metabolicamente activa. ^[28-29]

Se o processo microbiano continuar a determinada altura, no final da fase estacionária, os processos metabólicos começam a cessar e as células morrem rapidamente. Quando isto acontece, os microrganismos atingem a fase de morte normalmente acompanhada de lise celular. ^[28]

2.5 *Pichia stipitis*

O microrganismo escolhido neste estudo para a produção de etanol a partir dos açúcares presentes no licor de cozimento ao sulfito foi a levedura *Pichia stipitis*. A *P. stipitis*, é uma levedura que foi isolada pela primeira vez a partir da madeira apodrecida e a sua morfologia apresenta-se na Figura 2.4.

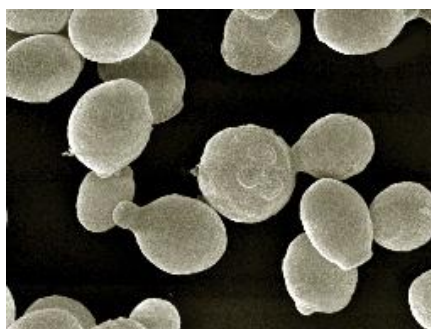


Figura 2.4 *Pichia stipitis* ^[30]

P. stipitis é um microrganismo anaeróbio facultativo que consegue utilizar como substrato glucose, xilose, manose e celobiose. Em condições aeróbias, com níveis elevados de oxigénio, *P. stipitis* apenas cresce a partir dos açúcares consumidos e com baixos níveis de oxigénio fermenta os açúcares e produz etanol. [31-33]

A temperatura óptima da *P. stipitis* situa-se entre 25 a 33 °C e o pH óptimo varia entre 4.5 e 5.5. [1] Esta levedura apresenta colónias com uma cor creme suave e um aspecto cremoso, as células apresentam formas esféricas, alongadas com cerca de 2,2 a 6µm que se reproduzem assexuadamente por gemulação lateral.

Para além dos açúcares, os micronutrientes desempenham um papel importante no crescimento e na produção de etanol pela *P. stipitis*. Estudos feitos anteriormente mostraram que utilizando meios contendo azoto, vitaminas, aminoácidos, purinas e pirimidinas, contribuíam para o aumento do crescimento e da produção de etanol por *P. stipitis*. [34]

2.6 Produção biológica de etanol

A fermentação alcoólica é um processo bioquímico de transformação de açúcares em etanol. É um processo realizado por alguns microrganismos que consiste na oxidação incompleta de glucose e de outros monossacarídeos em condições de microarejamento ou na ausência total de oxigénio.

Na fermentação alcoólica em leveduras, que ocorre através da via da glicólise ocorre formação de ácido pirúvico que é depois convertido em etanol em duas etapas. Na primeira etapa o ácido pirúvico é descarboxilado formando o acetaldeído e na segunda, o acetaldeído é reduzido pelo NADH a etanol como se pode observar na Figura 2.5. [28]

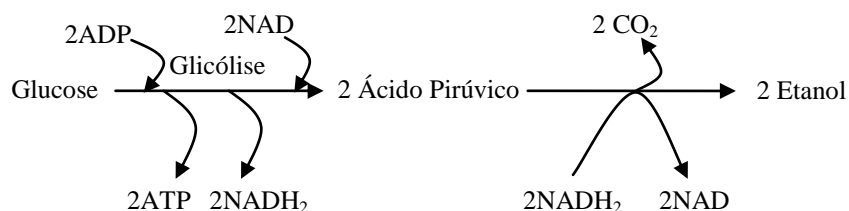


Figura 2.5 Esquema da fermentação alcoólica por leveduras. (Adaptado de [35])

A equação geral que traduz a fermentação alcoólica a partir de hexoses é:



A equação geral que traduz a fermentação alcoólica a partir de pentoses é ^[36]:



A Figura 2.6 descreve a fermentação da xilose a etanol, com formação do intermediário xilulose. A formação de xilulose pode ocorrer de duas formas: através da acção da xilose isomerase, normalmente em bactérias ou através da xilose reductase e xilitol desidrogenase mais comum nas leveduras. ^[36] Neste ultimo caso, a xilose é reduzida a xilitol pela enzima xilose reductase e requer a presença de NADPH como co-factor, segue-se a oxidação de xilitol a xilulose pela enzima xilitol desidrogenase com a presença de NAD⁺. ^[2]

A xilulose é posteriormente fosforilada pela enzima xiluloquinase a xilulose-5-fosfato com gasto de ATP. Através da via das pentose-fosfato a xilulose-5-fosfato transforma-se em gliceraldeído-3-fosfato. Este composto é convertido a piruvato através da via Embden-Meyerhof. Pela acção das enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase o piruvato é convertido em acetaldeído, dando origem ao etanol. ^[2]

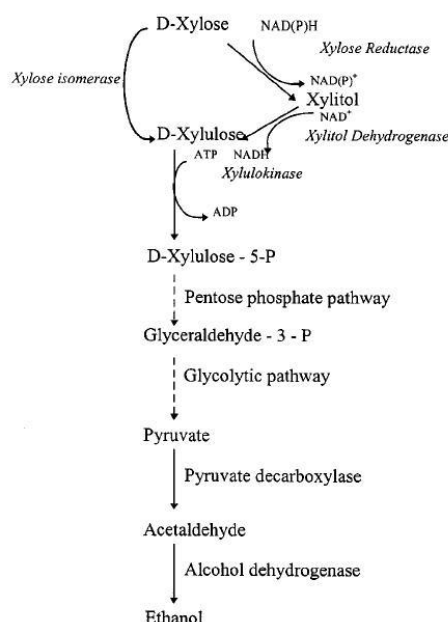


Figura 2.6 Esquema da degradação da xilose com a formação de ácido pirúvico com posterior formação de etanol. ^[36]

As hexoses são os monossacarídeos utilizados por um maior número de microrganismos. Entre as leveduras, o consumo destes açúcares está mais estudado para a *Saccharomyces cerevisiae*. Contudo, esta levedura não consegue fermentar pentoses como a xilose presente no HSSL, para a produção de etanol uma vez que não consegue fermentar o seu isómero, a xilulose.^[37-40] No entanto existem estirpes específicas capazes de utilizar pentoses para a produção de etanol, tais como as leveduras *P. stipitis*, *Pachysolen tannophilus* ou *Candida shehatei* e a bactéria *Zymomonas mobilis*.^[41] Dos microrganismos referidos, *P. stipitis* é o que apresenta um maior potencial para aplicação industrial pois é o que conduz a melhores rendimentos de etanol. Contudo esta levedura é sensível ao ácido acético presente nos resíduos lenhocelulósicos. O ácido acético inibe o crescimento celular e a produção de etanol.^[41-42] Diversas estirpes destas leveduras têm sido manipuladas geneticamente de modo a otimizar a produção de etanol a partir das hexoses e pentoses presentes nos resíduos lenhocelulósicos.

2.7 Controlo do fornecimento de oxigénio em sistemas industriais

Os bio-reactores ou fermentadores podem ter vários tamanhos, variando de 1 a 10L à escala laboratorial, até 500 m³ à escala industrial. O tamanho usado depende sempre do tipo de processo e do modo de operação a realizar. Os processos realizados em descontínuo requerem sempre fermentadores maiores do que nos processos contínuos e semi-contínuos.^[28]

Os fermentadores industriais podem ser divididos em duas classes, uns são usados para processos anaeróbios e outros para processos aeróbios. Os fermentadores onde ocorrem os processos anaeróbios não requerem equipamentos especiais, excepto para a remoção de calor gerado durante a fermentação, ao contrário dos fermentadores onde ocorrem os processos aeróbios que requerem equipamentos mais elaborados para assegurar uma boa mistura e fornecimento eficiente de oxigénio.^[28]

Os bio-reactores industriais são normalmente construídos em aço e são cilindros fechados na parte superior e inferior, onde várias tubagens e válvulas foram montadas para a entrada e saída de correntes líquidas e gasosas ou de soluções para controlo de pH, nível de líquido, etc. Devido às necessidades de esterilização e de remoção do calor gerado vitais para o sucesso do processo, utilizam-se camisas de arrefecimento que são colocadas no exterior do fermentador, onde circulam água e/ou vapor de água.^[28]

O sistema de fornecimento de oxigénio é uma parte crítica no bio-reactor. Num equipamento industrial, a transferência de oxigénio da fase gasosa para a fase líquida é um processo complexo e é preciso um equipamento apropriado para conseguir um arejamento

eficiente. Em fermentadores com grandes densidades celulares são requeridas elevadas quantidades de oxigénio, o que constitui um sério problema devido ao oxigénio ser pouco solúvel em água. ^[28]

Para garantir um arejamento eficiente no fermentador normalmente não só se considera a acção do dispersor, mas também a do agitador. O dispersor é um dispositivo metálico em forma de anel ou bocal, que contém pequenos furos pelos quais se dá a passagem de ar. O ar entra dentro do fermentador na forma de pequenas bolhas, através das quais o oxigénio se difunde para o líquido. ^[28]

Em fermentadores de tamanho reduzido, o dispersor por si só, deve ser suficiente para um bom arejamento, mas a nível industrial, o uso de agitadores é essencial. O agitador mais comum é composto por pás presas a um eixo central que está ligado a um motor de agitação. ^[28]

2.8 Transferência de massa em bio-reactores

Nos reactores biológicos, os fenómenos de transferência de massa são muito importantes, dado que a velocidade a que ocorrem pode influenciar ou até controlar a taxa de crescimento microbiano e a taxa de conversão de reagentes em produtos. A transferência de massa pode ocorrer através de diferentes processos, tais como: por difusão molecular, por convecção e através de uma película. O estudo da transferência de massa é crítico no caso do oxigénio devido à baixa solubilidade deste em água ^[43]. Mesmo em sistemas em que são necessárias condições microaerofílicas, o estudo da transferência de massa torna-se crítico devido ao aumento da biomassa. É importante garantir o contínuo fornecimento de oxigénio às culturas microbianas. A solubilidade do oxigénio diminui com o aumento da temperatura.

2.8.1 Transferência de massa gás-líquido

Um dos processos mais importantes de transferência de massa envolve o contacto de duas ou mais fases e a transferência de soluto através de uma barreira entre as duas fases. Na adsorção de gás, por exemplo, um soluto passa da fase gasosa para a superfície do líquido, onde é dissolvido e transferido para a fase líquida através de um processo chamado difusão. A velocidade de transferência de soluto depende de vários factores, tais como: a solubilidade do soluto no líquido e as condições físicas em que a transferência ocorre. Consequentemente a concepção dos equipamentos de transferência de massa tem de ter em conta factores como: a área de contacto interfacial, a distribuição das duas fases no reactor, a temperatura e pressão do processo. ^[44-45]

Na Figura 2.7, apresentam-se os vários passos de transferência de oxigênio da fase gasosa até às células. Conforme relatados em Bailey & Ollis (1986), as resistências consideradas nos sistemas trifásicos estão: ^[46-47]

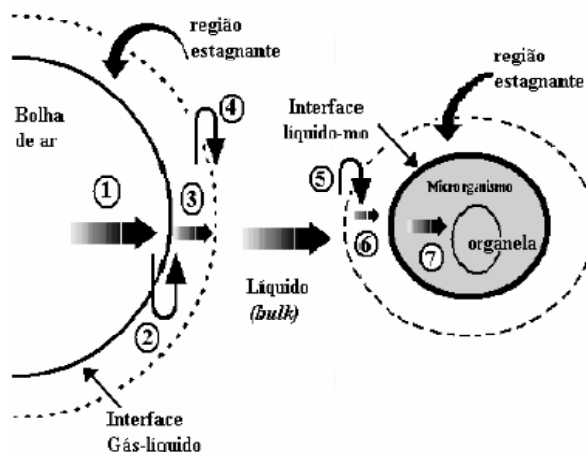


Figura 2.7 Fenômeno de transferência de massa que ocorre durante o transporte de oxigênio da fase gasosa para a célula num reactor biológico. (Adaptado de ^[43])

Conforme relatados em Bailey & Ollis (1986), as resistências consideradas nos sistemas trifásicos estão: ^[46-47]

- 1- No filme gasoso dentro da bolha, entre o seio do gás na bolha e na interface gás-líquido;
- 2- Na interface gás-líquido;
- 3- No filme líquido próximo à interface gás-líquido, entre essa interface e o meio líquido;
- 4- No meio líquido;
- 5- No filme entre o meio líquido e a interface líquido-sólido (resistência externa);
- 6- Na interface líquido-sólido;
- 7- Na fase sólida (resistência interna).

Diversos modelos têm sido estudados ao longo dos anos para descrever a transferência de massa através da interface, tais como: a teoria dos dois filmes proposta por Lewis e Whitman (1924) ou a teoria da penetração proposta por Higbie (1935), entre outros.

2.8.1.1 Teoria dos dois filmes

A teoria dos dois filmes, desenvolvida por Lewis e Whitman, descreve a transferência de massa de soluto entre duas fases através da interface. Este modelo assume que sempre que duas fases estão em contacto uma com a outra, forma-se uma película ou interface entre as duas fases. Admite também que toda a resistência à transferência de massa está contida nos dois filmes estagnados e nenhuma na interface, consequentemente, todas as concentrações interfaciais estão em equilíbrio. ^[44-45]

A representação gráfica da teoria dos dois filmes apresenta-se na Figura 2.8:

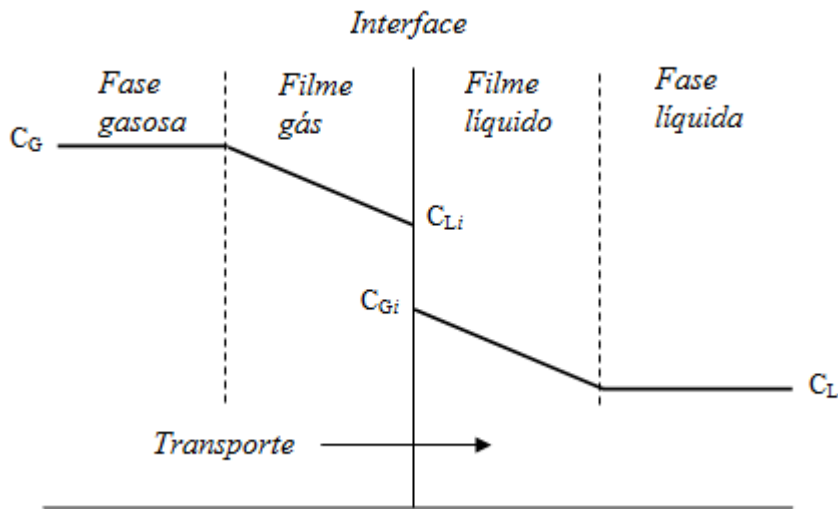


Figura 2.8 Representação gráfica da teoria dos dois filmes.

A força motriz para a transferência de massa resulta dos gradientes de concentração na vizinhança da interface e, assim sendo, o mecanismo de transferência de massa será a difusão molecular descrita pela lei de Fick (Eq. 2.8):

$$J_c = -D_c \frac{dC_c}{dz} \quad \text{Eq. 2.8}$$

Onde J_c ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) é o fluxo molar do componente c , D_c ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) é o coeficiente de difusão molecular do componente c e $\frac{dC_c}{dz}$ ($\text{mol m}^{-3} \text{m}^{-1}$) é o gradiente de concentração através da espessura, z (m), do filme.

O fluxo de transferência de massa pode ainda ser escrito em termos de um coeficiente de transferência de massa k (m s^{-1}). Em estado estacionário o fluxo, J_c de uma substância, c toma a forma:

$$J_c = k_G (C_{G,c} - C_{Gi,c}) = k_L (C_{L,c} - C_{Li,c}) \quad \text{Eq. 2.9}$$

Onde k_G e k_L são os coeficientes de transferência de massa no filme de gás e de líquido, $C_{G,c}$ e $C_{L,c}$ são as concentrações do componente c na bolha de gás e no seio do líquido, respectivamente, e $C_{Gi,c}$ e $C_{Li,c}$ são as concentrações na interface. ^[43]

O caudal molar por unidade de volume de líquido, \dot{Q}_c ($\text{mol m}^{-3} \text{s}^{-1}$) é obtido através de:

$$\dot{Q}_c = J_c a = k_G a (C_{G,c} - C_{Gi,c}) = k_L a (C_{L,c} - C_{Li,c}) \quad \text{Eq. 2.10}$$

Onde $a = A/V$ é a área específica para a transferência de massa ou área interfacial por unidade de volume de líquido, V (m^3).

A relação entre a pressão parcial de um gás e a sua fracção molar no líquido é dada pela lei de Henry:

$$p_g = H_c \cdot x_g \quad \text{Eq. 2.11}$$

Onde p_g é a pressão parcial do gás (atm), x_g é a fracção molar do gás (mol) e H_c é a constante de Henry ($\text{mol.atm}^{-1}\text{L}^{-1}$) para a substância c e depende do líquido e da temperatura. Com esta lei, é possível também relacionar as concentrações na interface, $C_{Gi,c} = H_c \cdot C_{Li,c}$. ^[43, 48] Contudo, as concentrações na interface não são normalmente conhecidas, recorrendo-se ao uso de um coeficiente global de transferência de massa K_L e a uma força directriz global, de acordo com a Eq. 2.12:

$$\dot{Q}_c = K_L a (C_{G,c}^* - C_{L,c}) \quad \text{Eq. 2.12}$$

Onde $C_{G,c}^*$ é a concentração de c na interface que está em equilíbrio com a pressão parcial de c no seio da fase gasosa. A equação que relaciona os coeficientes de transferência de massa, pode ser obtida conjugando as equações (2.10 e 2.12) com a lei de Henry. Assim sendo:

$$\frac{1}{K_L} = \frac{1}{k_L} + \frac{1}{Hk_G} \quad \text{Eq. 2.13}$$

Para gases pouco solúveis como o oxigénio em água, H é elevado e k_G é muito maior do que k_L , pelo que $K_L \approx k_L$, o que significa que a principal resistência à transferência de massa se encontra no filme de líquido e o respectivo coeficiente é aproximadamente igual ao coeficiente global de transferência de massa.

2.8.1.2 Teoria da penetração de Higbie

Higbie verificou que em muitas situações o tempo de exposição de um fluido à transferência de massa é curto, não existindo tempo suficiente para o gradiente de concentrações se desenvolver. ^[45]

Esta teoria foi concebida para descrever o contacto de dois fluidos como mostra a Figura 2.9.

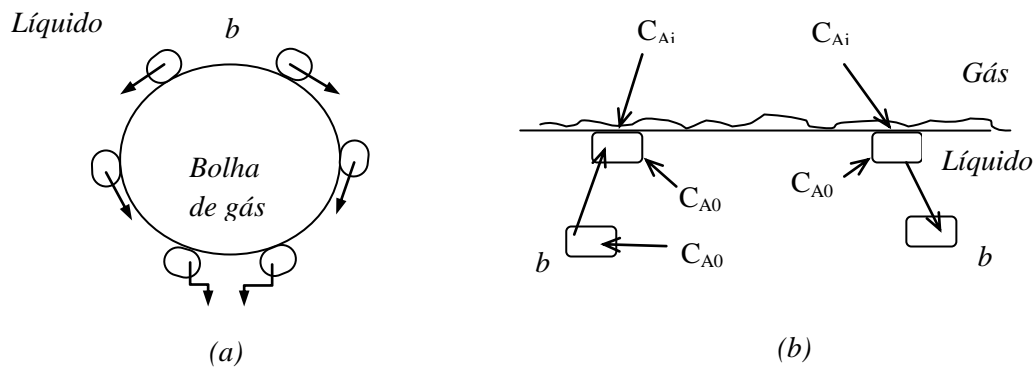


Figura 2.9 Representação da teoria da penetração. (Adaptado de ^[45])

Como se observa na Figura 2.9 (a), uma bolha de gás ascende através do líquido que absorve o gás. Uma partícula de líquido b , inicialmente no topo da bolha fica em contacto com o gás por um tempo t , necessário para que esta percorra uma distância igual ao seu diâmetro, ao mesmo tempo em que a partícula de líquido desliza ao longo da superfície da bolha de ar. ^[45]

A Figura 2.9 (b) descreve o caso em que o líquido se encontra em movimento turbulento. Neste caso, uma partícula de líquido b ascende até a superfície em movimento e lá permanece por um tempo t , ficando exposto à superfície do gás. Nesta teoria, o tempo de exposição é tomado como constante para toda a superfície em movimento ou para todas as partículas de líquido. ^[45] Inicialmente, a concentração de gás dissolvido na partícula de líquido é considerada C_{A0} , e considera-se que todo o líquido em movimento está estagnado. Quando a partícula gasosa entra em contacto com a superfície que se encontra em movimento, a sua concentração passa a ser C_{Ai} .

Durante um tempo t , a partícula de líquido é sujeita a uma difusão ou penetração em estado transiente e percorre uma distância z .^[44-45]

Esta difusão ou penetração pode ser descrita pela 2ª lei de Fick.

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} = D_{AB} \frac{\partial^2 C_A}{\partial z^2} \quad \text{Eq. 2.14}$$

Sendo C_A , a concentração da espécie A , D_{AB} é o coeficiente de difusão entre A e B , t é o tempo e z a distância percorrida.

Para tempos de exposição curtos e admitindo uma difusão lenta das partículas de gás no líquido, as moléculas de soluto não são capazes de atingir a profundidade z , correspondente à espessura do líquido em movimento, assim sendo, admite-se que a espessura é infinita. Logo, admite-se como condição fronteira:^[45]

$$C_A = \begin{cases} C_{A0} & \text{para } t = 0 \\ C_{A,i} & \text{para } z = 0 \\ C_{A0} & \text{para } z = \infty \end{cases}$$

Derivando a Eq. 2.14, obtêm-se a expressão para a determinação do fluxo molar de transferência de oxigénio através da interface gás-líquido ($z = 0$):^[45]

$$J_{Az} \big|_{z=0} = k_c (C_{A,i} - C_{A0}) \quad \text{Eq. 2.15}$$

Onde

$$k_c = \sqrt{\frac{D_{AB}}{\pi t}} \quad \text{Eq. 2.16}$$

2.9 Transferência de oxigénio num processo microbiano

A taxa de transferência de oxigénio (OTR), pode ser descrita por:

$$OTR = k_L a \cdot (C^* - C) \quad \left(mmolO_2 \cdot L^{-1} \cdot h^{-1} \right) \quad \text{Eq. 2.17}$$

Onde k_L é o coeficiente de transferência de massa da fase líquida (cm/h), a é a área interfacial gás-líquido (cm²/cm³), $k_L a$ é o coeficiente volumétrico de transferência de oxigénio (h⁻¹), C^* é a concentração de saturação do oxigénio dissolvido (mmolO₂/L) e C é a concentração de oxigénio dissolvido no líquido (mmolO₂/L). Esta equação deriva da Eq. 2.12. ^[49]

2.9.1 Factores que influenciam a taxa de transferência de oxigénio

A taxa de transferência de oxigénio em fermentadores depende de vários factores como: a geometria do reactor, o tipo de agitador usado, as propriedades do fluido (viscosidade, tensão superficial, etc.), e a energia dissipada no fluido (que depende do caudal de ar, velocidade de agitação, etc). Desta forma, a composição e as propriedades reológicas do meio, ao mudarem com o tempo, influenciam significativamente a taxa de transferência de oxigénio. ^[50]

A taxa de transferência de oxigénio aumenta com o aumento de caudal de ar e com o aumento da velocidade de agitação. ^[51]

2.9.2 Coeficiente volumétrico de transferência de massa, $k_L a$

De acordo com a Eq. 2.17, existem três parâmetros envolvidos na taxa de transferência de oxigénio: o coeficiente de transferência de massa da fase líquida (k_L), a área interfacial (a) e a força motriz definida por $(C^* - C)$. Como experimentalmente é difícil determinar os valores de (k_L) e (a) separadamente, opta-se pela determinação do coeficiente volumétrico de transferência de massa, ($k_L a$) sendo este definido pelo produto entre o coeficiente de transferência de massa da fase líquida com a área interfacial. O $k_L a$ é usado para avaliar a capacidade de arejamento num reactor. Este coeficiente depende do tipo de reactor usado e das condições de operação, aumentando com o aumento da velocidade de agitação. ^[43]

2.9.3 Métodos usados na determinação do coeficiente volumétrico de transferência de massa, k_La

2.9.3.1 Método estático da desgaseificação

Este método consiste no desarejamento inicial do reactor. Este desarejamento é conseguido, injectando azoto para o meio até que se atinja uma concentração de oxigénio dissolvido muito baixa, perto de 0%. Esta evolução é registada com a ajuda de um eléctrodo polarográfico. Quando a concentração de oxigénio dissolvido se encontra perto de zero, a injeção de azoto é interrompida e inicia-se o borbulhamento do meio com um caudal de ar, monitorizando e registando ao longo do tempo a concentração de oxigénio dissolvido.

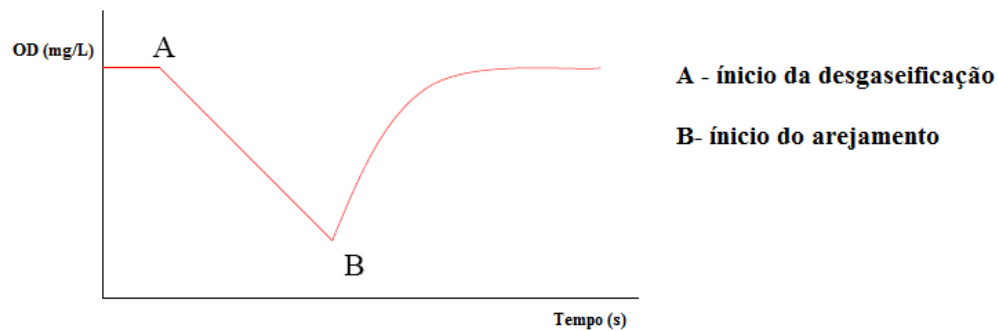


Figura 2.10 Representação gráfica da concentração de oxigénio dissolvido em função do tempo.

O processo de arejamento provoca um aumento da concentração de oxigénio dissolvido. Este aumento pode ser descrito pela Eq. 2.18:

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a \cdot (C^* - C_L) \quad \text{Eq. 2.18}$$

Integrando a equação anterior, obtêm-se:

$$\ln\left(\frac{C^* - C_L}{C^*}\right) = k_L a \cdot t \quad \text{Eq. 2.19}$$

Introduzindo os valores experimentais da concentração de oxigénio dissolvido ao longo do tempo e representando-os graficamente, obtêm-se uma recta cujo declive é o simétrico de $k_L a$.

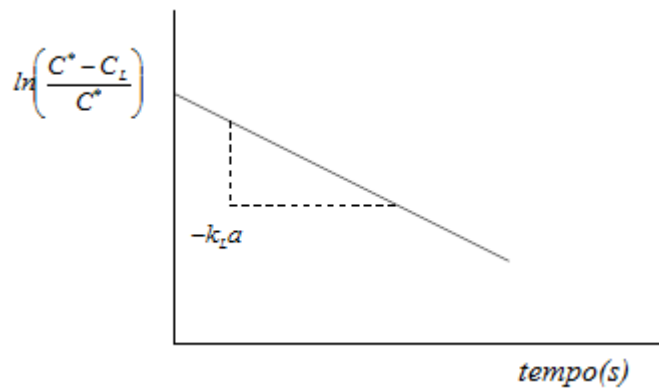


Figura 2.11 Representação gráfica de $\ln((C^* - C_L)/(C^*))$ em função do tempo.

2.9.3.2 Método dinâmico (*in situ*)

Experimentalmente neste método, desliga-se o fornecimento de ar no instante t_0 e a concentração de oxigénio dissolvido diminui, a uma velocidade constante, resultado do consumo de oxigénio pelos microrganismos. Quando a concentração do oxigénio dissolvido é baixa, mas acima da concentração crítica, no instante t_1 , abre-se de novo a alimentação do ar de forma a atingir a concentração de saturação.

O balanço de massa ao oxigénio dissolvido num fluido contendo células vivas, pode ser descrito pela Eq. 2.20:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a \cdot (C^* - C_L) - q_{O_2} \cdot X \quad \text{Eq. 2.20}$$

Onde, q_{O_2} é a taxa específica de consumo de oxigénio e X é a concentração de biomassa.

Rearranjando a equação anterior, vem que:

$$C_L = -\frac{1}{k_L a} \left(\frac{dC_{O_2}}{dt} + q_{O_2} \cdot X \right) + C^* \quad \text{Eq. 2.21}$$

Representando graficamente a equação obtida, obtêm-se uma recta cujo declive é o inverso de $k_L a$.

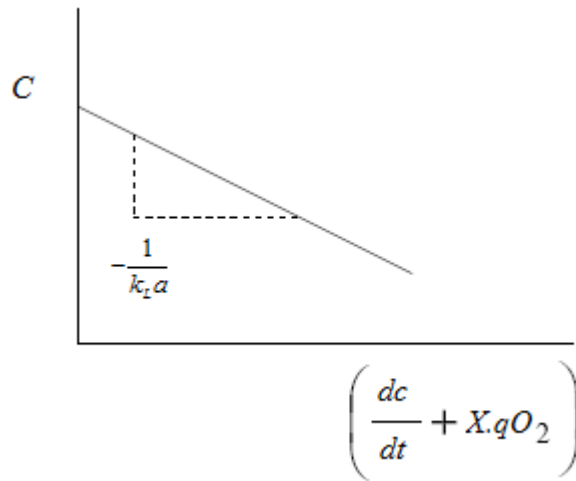


Figura 2.12 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de massa pelo método dinâmico.

Considerando estado estacionário no reactor:

$$k_L a \cdot (C^* - C_{L,0}) = q_{O_2} \cdot X \quad \text{Eq. 2.22}$$

Onde $C_{L,0}$ é a concentração de oxigénio dissolvido no momento que antecede a suspensão do arejamento.

$$\begin{aligned} \frac{dC_L}{dt} &= k_L a \cdot (C^* - C_L) - k_L a \cdot (C^* - C_{L,0}) = k_L a \cdot (C_{L,0} - C_L) \\ \ln \left(\frac{C_{L,0} - C_L}{C_{L,0} - C_{L,1}} \right) &= -k_L a \cdot (t - t_1) \end{aligned} \quad \text{Eq. 2.23}$$

$C_{L,1}$ é a concentração de oxigénio dissolvido e t_1 é o instante em que o arejamento é reiniciado.

2.10 Taxa de consumo de oxigénio

A taxa de consumo de oxigénio (OUR), depende:

- da taxa específica de consumo de oxigénio (q_{O_2})
- da concentração da biomassa (X)

$$OUR = q_{O_2} \cdot X \quad \left(mmol O_2 \cdot L^{-1} \cdot h^{-1} \right) \quad \text{Eq. 2.24}$$

q_{O_2} depende do tipo de célula, do substrato, da concentração do substrato, da temperatura e das condições de crescimento e concentração de oxigénio. ^[43]

Assim sendo, a variação da concentração de oxigénio em função do tempo pode ser descrita por:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = OTR - OUR \quad \text{Eq. 2.25}$$

3 Materiais e Métodos

3.1 Microrganismos

O microrganismo utilizado neste trabalho, a levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124, foi fornecida pela “*Agricultural Research Service Culture Collection*” do “*National Center for Agricultural Utilization Research*” do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América.

3.2 Meios de cultura

3.2.1 Meio YM (yeast medium)

O meio YM, cuja composição se apresenta na Tabela 2, foi preparado em água destilada e esterilizado durante 20 minutos a 120 °C em autoclave.

Tabela 2 - Composição do meio YM.

Componente	Concentração (gL ⁻¹)
Agar (para meio sólido)	20.0
Glucose	10.0
Extracto de levedura	3.0
Extracto de malte	3.0

3.2.2 Meio MS (meio suplementar):

O meio MS, cuja composição se apresenta na Tabela 3, foi preparado em água destilada e esterilizado durante 20 minutos a 120 °C em autoclave com os sais de amónia separados dos restantes componentes, de modo a evitar a precipitação dos mesmos.

Tabela 3 - Composição do meio MS.

Componente	Concentração (gL ⁻¹)
Extracto de levedura	2.5
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5

3.2.3 Licor de cozimento ao sulfito ácido:

Neste trabalho foi utilizado como substrato o licor de cozimento ao sulfito ácido (HSSL) gentilmente cedido pela indústria papelreira CAIMA S.A.[®] O HSSL foi recolhido a uma temperatura de aproximadamente 80 °C, na saída do evaporador nº7, em frascos previamente esterilizados e rolhados com filtro de ar e tubagens para a saída do vapor. Depois de recolhido e arrefecido, foi mantido a 4 °C. Posteriormente, o HSSL foi sujeito a um pré-tratamento químico e a um tratamento biológico de modo a eliminar possíveis inibidores de *P. stipitis*.

3.2.3.1 Pré-tratamento químico do HSSL:

O pré-tratamento do HSSL foi realizado em três passos.

No primeiro passo, adicionou-se hidróxido de potássio (KOH) de modo a aumentar o valor de pH do licor de 3.36 para 7.5. O HSSL foi colocado durante 16 horas a 4 °C, promovendo-se a precipitação das impurezas existentes.

De seguida, procedeu-se à oxigenação com ar comprimido do HSSL de modo a oxidar os diversos compostos que precipitaram. A razão tempo de oxigenação/volume de HSSL utilizada foi de 4 horas por cada 2 L de HSSL. Posteriormente o HSSL foi centrifugado durante 60 minutos a 2000 rpm de modo a induzir a sedimentação das substâncias precipitadas.

Por fim, o HSSL foi filtrado sob vácuo usando um filtro de 1 µm de diâmetro de poro, em câmara de fluxo laminar.

O HSSL após o tratamento foi armazenado num frasco estéril e colocado numa câmara frigorífica a 4 °C.

3.2.3.2 Tratamento biológico do HSSL com *Paecilomyces variotti*:

Para promover a desintoxicação do licor, nomeadamente a diminuição da concentração do ácido acético existente no licor, inoculou-se o fungo *Paecilomyces variotti* no HSSL, que cresce consumindo parte dos inibidores do metabolismo de *P. stipitis*. Após este tratamento, cada litro de HSSL foi centrifugado durante 20 minutos a 14000 rpm e a 4 °C de modo a remover os sólidos existentes. Por fim o HSSL foi filtrado usando membranas de poro com diâmetro 0.2µm.

3.3 Estudo da transferência de oxigénio na ausência de *P. stipitis*

O objectivo destes ensaios consistiu no estudo da transferência de massa do oxigénio em água e em HSSL na ausência de microrganismos. Nestes ensaios, o coeficiente de transferência de massa, (k_La) e a taxa de transferência de oxigénio, (OTR) foram avaliados através do método estático da degaseificação. Como descrito anteriormente na (secção 2.9.3.1), procedeu-se ao desarejamento inicial do reactor, injectando azoto para o meio reaccional até se ter atingido uma concentração de oxigénio dissolvido, perto de 0%. A injeção de azoto foi então interrompida e de seguida iniciou-se o borbulhamento do meio com um caudal total de gás contendo uma mistura de ar e azoto numa determinada proporção fixa. Esta evolução foi registada e monitorizada com a ajuda de um sensor de oxigénio polarográfico (METTLER TOLEDO), registando ao longo do tempo a concentração de oxigénio dissolvido. Os ensaios foram realizados num fermentador BIOLAB, (B.BRAUN) de capacidade máxima 1 L equipado com controlo de temperatura, agitação, pH e arejamento e com saída para o exterior através de dois filtros estéreis. O arejamento foi assegurado por dois controladores de caudal mássico, um para o caudal de ar comprimido e outro para o caudal de azoto. O sistema estava ligado a um computador para aquisição dos valores de oxigénio dissolvido (DO) através de uma placa de aquisição (NATIONAL INSTRUMENTS), com o auxílio de um *software* construído em Lab View. O volume útil do fermentador utilizado foi de 800 mL e todos os ensaios foram realizados a 29 °C.

Para os ensaios realizados em água, foram calculadas as fracções molares de oxigénio e azoto em água de acordo com a lei de Henry. Desta forma foi possível determinar as concentrações de saturação dos dois gases a 29 °C. As fracções molares foram calculadas através de:

$$\ln x = A + \frac{B}{T} + C \ln(T) + DT \quad \text{Eq. 3.1}$$

Onde T é a temperatura (K) e x é a fracção molar do soluto. As constantes A, B, C e D para cada gás podem ser encontradas no *Perry e Green* ^[48] na tabela 2-123 da pág. 2-130.

3.3.1.1 Ensaios em água

Nestes ensaios testaram-se os efeitos da velocidade de rotação (100 rpm e 180 rpm), do caudal total de gás fornecido ao reactor (100 mL/min e 200 mL/min ou 0.125 vvm e 0.250 vvm, respectivamente) e da mistura de gases (ar comprimido e azoto) em diferentes proporções, na transferência de massa, que correspondem às seguintes composições finais de oxigénio e de azoto: 1.05% O₂ e 98.95% N₂; 2.10% O₂ e 97.90% N₂; 4.20% O₂ e 95.80% N₂; 6.30% O₂ e 93.70% N₂ e por fim 12.60% O₂ e 87.40% N₂, efectuando-se um total de 20 ensaios.

3.3.1.2 Ensaios em HSSL

Para estes ensaios, testaram-se os efeitos da velocidade de rotação (100 rpm e 180 rpm), do caudal total de gás (100 mL/min e 200 mL/min ou 0,125 vvm e 0,250 vvm, respectivamente) e da mistura de gases (ar comprimido e azoto) em diferentes proporções, na transferência de massa que correspondem às seguintes composições finais de oxigénio e de azoto: 1.05% O₂ e 98.95% N₂; 2.10% O₂ e 97.90% N₂ e por fim 4.20% O₂ e 95.80% N₂, efectuando-se um total de 12 ensaios.

3.4 Estudo da transferência de oxigénio em fermentações de *P. stipitis*

3.4.1 Preparação de pré-inóculos e inóculos

As culturas sólidas de *P. stipitis* foram preparadas com meio de manutenção YM em placas de Petri, tendo sido inoculadas a partir de colónias previamente crescidas no mesmo meio. Após a inoculação, as placas foram incubadas a 29 °C durante 72 horas numa estufa.

Para se obter o pré-inóculo, retirou-se uma colónia de *P. stipitis* em cultura sólida com uma ansa de inoculação estéril e colocou-se em 80 mL de meio YM. Todo o procedimento foi realizado em condições de esterilidade, à chama numa câmara de fluxo laminar. O pré-inóculo foi, de seguida, incubado a 29 °C com agitação orbital de 180 rpm durante 24 horas.

Para a obtenção do inóculo, retiraram-se 5 mL de pré-inóculo para um Erlenmeyer com 75 mL de meio YM. O inóculo foi, de seguida, incubado a 29 °C durante com agitação orbital de 180 rpm durante 16 horas.

Após este período procedeu-se à transferência do inóculo para o biorreactor.

3.4.2 Ensaios biológicos

Os ensaios biológicos foram efectuados num sistema semelhante ao descrito para os ensaios na ausência de microrganismos (Secção 3.3). Todas as fermentações foram realizadas com as mesmas proporções de inóculo, meio mineral e HSSL para um total de volume útil: 80 mL, 240 mL e 480 mL, respectivamente.

Foram efectuados quatro ensaios biológicos a 29 °C em que foram testadas as seguintes condições: caudal total de gás fornecido ao reactor (100 mL/min e 200 mL/min ou 0.125 vvm e 0.250 vvm, respectivamente) e percentagens de ar comprimido e azoto que correspondem às seguintes composições finais de oxigénio e de azoto: 4.20% O₂ e 95.80% N₂ e 8.40% O₂ e 91.60% N₂, mantendo a velocidade de rotação constante, 180 rpm. Em cada ensaio foram determinados os seguintes parâmetros: taxa de transferência de oxigénio (*OTR*), coeficiente de transferência de massa (*k_{La}*) e a taxa de consumo de oxigénio (*OUR*) pelo método dinâmico (*in situ*). Como descrito anteriormente na (secção 2.9.3.2), o fornecimento de ar foi desligado no instante *t*₀ e a concentração de oxigénio dissolvido diminuiu a uma velocidade constante, resultado do consumo de oxigénio pelos microrganismos. Quando a concentração do oxigénio dissolvido atingiu um valor baixo, mas acima da concentração crítica, no instante *t*₁, forneceu-se novamente ar de forma a atingir a concentração de saturação.

Durante os ensaios foram recolhidas amostras de 2 mL assépticamente que posteriormente, foram usadas para a determinação do pH, das concentrações de biomassa e de xilose, glucose, etanol e ácido acético após centrifugação a 1200 rpm durante 10 minutos. Durante os ensaios, inocularam-se placas de Petri com meio YM com cerca de 1 mL de volume reaccional de modo a controlar a pureza da cultura microbiana no biorreactor.

3.5 Determinação da concentração de biomassa

A determinação da biomassa foi feita a partir de uma curva de calibração, que relaciona a concentração celular com a densidade óptica. Esta curva foi obtida pela conjugação de dois métodos, o método gravimétrico e o método turbidimétrico. Para determinar a concentração celular da biomassa presente no meio fermentativo, foram retiradas quatro amostras, três de 30.00 ± 0.02 mL e uma de 10.00 ± 0.02 mL no final da primeira fermentação.

3.5.1 Método gravimétrico

Neste método, as amostras de 30.00 ± 0.02 mL retiradas no final da fermentação foram filtradas utilizando membranas de acetato de celulose com $0.2 \mu\text{m}$ de poro (*Sartorius*). Após a filtração, as membranas foram recolhidas e colocadas em caixas de Petri previamente pesadas para posterior secagem na estufa a 105°C durante 72 horas. Após este período, as membranas foram arrefecidas num exsiccador até o valor da massa estabilizar. O peso seco da amostra foi então determinado subtraindo o peso da membrana vazia seca ao peso do conjunto obtido, dividindo pelo volume da amostra.

3.5.2 Método turbidimétrico

De modo a obter uma relação linear entre a concentração celular e a densidade óptica, a amostra de 10.00 ± 0.02 mL que tinha sido retirada anteriormente no final da fermentação, foi diluída em diferentes proporções (1/10 – 4/5). A absorvância destas amostras foi lida a 650nm, num espectrofotómetro de duplo feixe *Shimadzu UVmini-1240*. Deste modo e conjugando os resultados obtidos nos dois métodos, obteve-se a curva de calibração, Figura 7.1, que pode ser consultada no Anexo 1.

3.6 Determinação da concentração de substratos e produto através de HPLC

Para a determinação da concentração de ácido acético, xilose, glucose e etanol durante os ensaios biológicos por HPLC, cromatografia líquida de alta eficiência, utilizou-se o sobrenadante das amostras recolhidas ao longo do tempo de operação. O sobrenadante foi centrifugado com filtros de $0.2\mu\text{m}$ a 10000 rpm durante 10 minutos para retirar impurezas que pudessem danificar o sistema de cromatografia. O sobrenadante purificado foi então injectado num sistema de cromatografia líquida equipado com uma coluna de troca iónica com enchimento *Eurokat®* de $10 \mu\text{m}$ (*Knauer*), bomba *Gilson 307*, detector de índice de refração *Gilson 131*. Utilizou-se H_2SO_4 0.01N como eluente, com um caudal de 0.4 mL/min e a uma temperatura de 40°C .

A fim de obter as curvas de calibração e os tempos de retenção dos respectivos compostos, foram injectados padrões dos quatro compostos analisados (glucose, xilose, ácido acético e etanol).

As curvas de calibração para os quatro compostos analisados encontram-se no Anexo 1.

4 Resultados

4.1 Estudo da transferência de oxigénio

4.1.1 Estudo da transferência de oxigénio em água

O objectivo destes ensaios foi a determinação de parâmetros como a concentração de saturação de oxigénio em água, o coeficiente volumétrico de transferência de massa, k_{La} , e a taxa de transferência de oxigénio, OTR para diferentes condições operacionais. Nestes ensaios efectuados a 29 °C, forneceram-se ao sistema misturas de ar comprimido e azoto que correspondem às seguintes composições finais de oxigénio e de azoto: 1.05% O₂ e 98.95% N₂; 2.10% O₂ e 97.90% N₂; 4.20% O₂ e 95.80% N₂; 6.30% O₂ e 93.70% N₂ e por fim 12.60% O₂ e 87.40% N₂. Estudou-se também o efeito do caudal total de gás fornecido testando-se os valores de 100 mL/min e 200 mL/min ou 0.125 vvm e 0.250 vvm, respectivamente e o efeito da velocidade de rotação 100 rpm e 180 rpm. Na Tabela 4 apresentam-se os valores obtidos para o coeficiente volumétrico de transferência de massa, k_{La} , e para a taxa de transferência de oxigénio, OTR calculadas para as diferentes condições experimentais testadas. Apresentam-se ainda percentagens de oxigénio e de azoto fornecidas em cada condição experimental estudada.

Tabela 4 - Valores de k_{La} e OTR obtidos para a água a 29 °C.

%O ₂ %N ₂	V _{rotação} (rpm)	100		180	
	Q _{total} (mL/min)	100	200	100	200
1.05 98.95	k_{La} (h ⁻¹)	5.24 ± 0.08	6.63 ± 0.09	8.30 ± 0.13	11.64 ± 0.15
	OTR (mmolO ₂ /Lh)	0.064 ± 1.07×10 ⁻³	0.070 ± 9.18×10 ⁻⁴	0.101 ± 1.65×10 ⁻³	0.131 ± 1.74×10 ⁻³
2.10 97.90	k_{La} (h ⁻¹)	3.57 ± 0.02	6.40 ± 0.03	7.00 ± 0.04	11.14 ± 0.06
	OTR (mmolO ₂ /Lh)	0.078 ± 3.40×10 ⁻⁴	0.156 ± 7.49×10 ⁻⁴	0.164 ± 9.05×10 ⁻⁴	0.275 ± 1.58×10 ⁻³
4.20 95.80	k_{La} (h ⁻¹)	3.84 ± 0.02	6.36 ± 0.05	5.78 ± 0.02	10.97 ± 0.09
	OTR (mmolO ₂ /Lh)	0.186 ± 9.68×10 ⁻⁴	0.310 ± 2.67×10 ⁻³	0.284 ± 1.35×10 ⁻³	0.525 ± 4.75×10 ⁻³
6.30 93.70	k_{La} (h ⁻¹)	3.99 ± 0.01	6.12 ± 0.06	6.77 ± 0.03	10.96 ± 0.04
	OTR (mmolO ₂ /Lh)	0.286 ± 1.25×10 ⁻³	0.440 ± 4.39×10 ⁻³	0.544 ± 2.79×10 ⁻³	0.788 ± 3.24×10 ⁻³
12.60 87.40	k_{La} (h ⁻¹)	3.66 ± 0.01	6.78 ± 0.02	6.35 ± 0.02	10.85 ± 0.03
	OTR (mmolO ₂ /Lh)	0.519 ± 1.43×10 ⁻³	0.964 ± 3.01×10 ⁻³	0.904 ± 3.69×10 ⁻³	1.539 ± 4.88×10 ⁻³

Num sistema de arejamento, o oxigénio presente numa bolha de ar é transferido para a interface gás-líquido através de um processo de difusão. A principal resistência à transferência de oxigénio é o filme de líquido em torno da bolha de ar.^[43] O k_La representa o inverso da resistência apresentada à difusão, ou seja, quanto maior for o valor de k_La , menor é a resistência apresentada à transferência de oxigénio e a concentração de saturação é atingida mais rapidamente.

Os valores obtidos para o coeficiente volumétrico de transferência de massa, k_La , em função da percentagem de oxigénio apresentam-se na Figura 4.1.

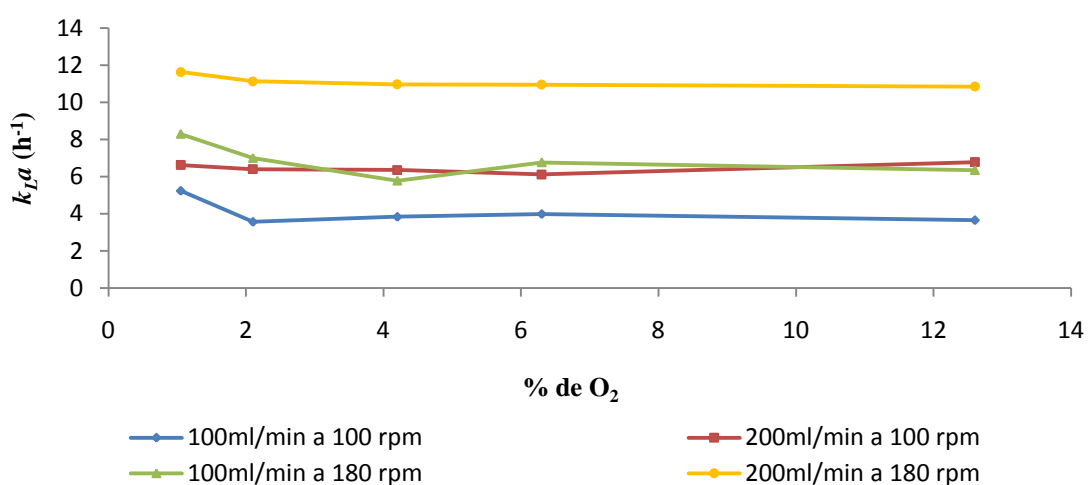


Figura 4.1 Variação dos valores de k_La em função da percentagem de oxigénio presente em cada ensaio experimental e para cada um dos caudais e velocidades de rotação testados.

De acordo com a Tabela 4 e com a Figura 4.1, é possível observar que para a mesma percentagem de oxigénio mantendo o mesmo caudal total de gás à entrada do reator, o coeficiente volumétrico de transferência de massa, k_La aumentou com a velocidade de rotação e mantendo a mesma velocidade de rotação, o coeficiente volumétrico de transferência de massa, k_La aumentou com o caudal total de gás à entrada do reator.

Os valores obtidos para a taxa de transferência de oxigénio, *OTR* em função da percentagem de oxigénio apresentam-se na Figura 4.2.

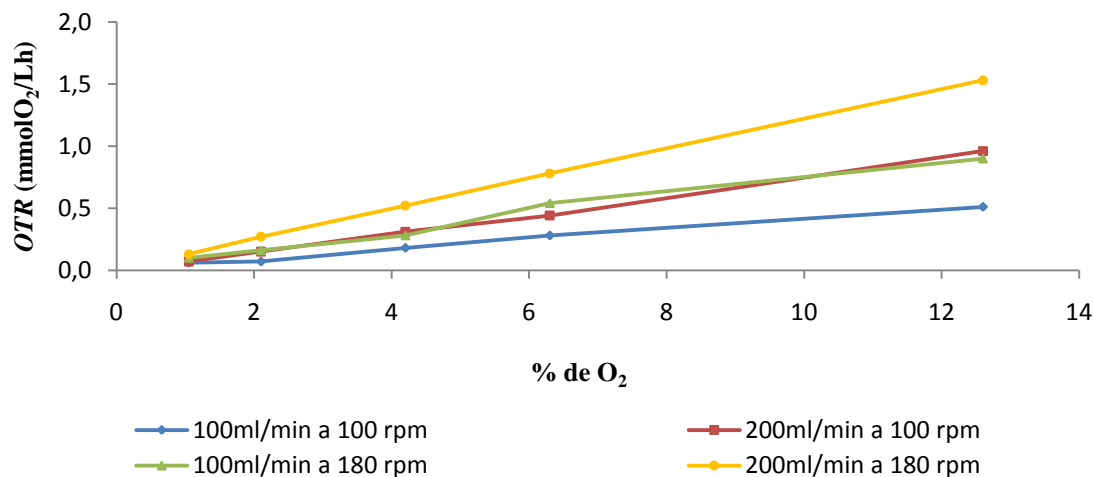


Figura 4.2 Variação dos valores de *OTR* em função da percentagem de oxigénio presente em cada ensaio experimental e para cada um dos caudais e velocidades de rotação testados.

De acordo com a Tabela 4 e a com a Figura 4.2 é possível observar que a taxa de transferência de oxigénio, *OTR*, aumentou com a velocidade de rotação, com o caudal total de gás à entrada do reactor e com a percentagem de oxigénio presente na corrente gasosa.

Foram realizados ao longo dos anos diversos estudos sobre a influência da velocidade de agitação e do caudal total de gás fornecido ao reactor, no coeficiente volumétrico de transferência de massa, k_La e na taxa de transferência de oxigénio, *OTR*. García-Ochoa *et al* ^[50] estudou a influência da velocidade de agitação e do caudal total de gás fornecido ao reactor no coeficiente volumétrico de transferência de massa e na taxa de transferência de oxigénio, usando como microrganismo a bactéria *Xanthomonas campestris* e como substrato um meio rico em sacarose. De igual modo, Patel *et al* ^[52] realizou o seu estudo usando como microrganismos os fungos *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* e como substrato um meio rico em sacarose. Ambos verificaram que o k_La aumentava com o aumento da velocidade de rotação e com o aumento do caudal total de gás. Os resultados obtidos eram esperados, uma vez que de acordo com os autores acima citados, o coeficiente volumétrico de transferência de massa, k_La , aumenta com a velocidade de rotação e com o caudal total de gás à entrada do reactor, aumentando por consequência a taxa de transferência de oxigénio, *OTR*.

Para os ensaios realizados em água, foram calculadas as concentrações de saturação de oxigénio e azoto teóricas. A concentração de saturação de um gás dissolvido num líquido depende

do tipo de gás e da pressão parcial desse gás. Pela lei de Henry foi possível calcular as concentrações de saturação teóricas e relacioná-las com a concentração de saturação de oxigénio obtida experimentalmente para a água a 29 °C. Na Tabela 5 apresentam-se os resultados obtidos.

Tabela 5 – Concentração de saturação de Oxigénio e Azoto teóricos e Concentração de saturação de oxigénio obtida experimentalmente.

% O ₂ % N ₂	V _{rotação} (rpm)	100		180	
	C _{total} (ml/min)	100	200	100	200
1.05 98.95	$C_{teo}^*(O_2)$ (mmolO ₂ /L)	0.013			
	$C_{teo}^*(N_2)$ (mmolN ₂ /L)	0.611			
	$C_{exp}^*(O_2)$ (mmolO ₂ /L)	0.012	0.011	0.012	0.012
2.10 97.90	$C_{teo}^*(O_2)$ (mmolO ₂ /L)	0.025			
	$C_{teo}^*(N_2)$ (mmolN ₂ /L)	0.610			
	$C_{exp}^*(O_2)$ (mmolO ₂ /L)	0.022	0.024	0.024	0.025
4.20 95.80	$C_{teo}^*(O_2)$ (mmolO ₂ /L)	0.050			
	$C_{teo}^*(N_2)$ (mmolN ₂ /L)	0.596			
	$C_{exp}^*(O_2)$ (mmolO ₂ /L)	0.048	0.048	0.049	0.048
6.30 93.70	$C_{teo}^*(O_2)$ (mmolO ₂ /L)	0.075			
	$C_{teo}^*(N_2)$ (mmolN ₂ /L)	0.584			
	$C_{exp}^*(O_2)$ (mmolO ₂ /L)	0.072	0.072	0.071	0.072
12.60 87.40	$C_{teo}^*(O_2)$ (mmolO ₂ /L)	0.151			
	$C_{teo}^*(N_2)$ (mmolN ₂ /L)	0.545			
	$C_{exp}^*(O_2)$ (mmolO ₂ /L)	0.142	0.143	0.142	0.141

No ar existem aproximadamente 21% de oxigénio e 79% de azoto, desprezando a presença de gases raros e de CO₂ devido às suas concentrações serem muito inferiores. Assim sendo, para uma mistura de 21% de oxigénio e 79% de azoto, obteve-se para o oxigénio uma concentração de saturação de $C_{O_2}^* = 0.252$ mmolO₂/L e para o azoto obteve-se uma concentração de saturação de $C_{N_2}^* = 0.492$ mmolN₂/L em água. De forma análoga, foi possível determinar as concentrações de saturação teóricas de ambos os gases, para as diferentes proporções usadas em cada ensaio

experimental. Pela Tabela 5, observa-se que as concentrações de saturação de oxigénio obtidas experimentalmente não apresentam desvios significativos relativamente às obtidas teoricamente para cada ensaio experimental. De acordo com a lei de Henry é possível constatar que para uma mistura com uma pressão parcial de oxigénio inferior à pressão parcial de oxigénio no ar, obtém-se uma fracção molar de equilíbrio de oxigénio dissolvido inferior e por consequência uma concentração de saturação de oxigénio inferior. Do mesmo modo, com uma pressão parcial de azoto superior à pressão parcial de azoto no ar, obtém-se uma fracção molar de equilíbrio de azoto dissolvido superior e por consequência uma concentração de saturação de azoto superior. ^[53]

A concentração de saturação de oxigénio em água nunca foi atingida nestes ensaios, uma vez que a quantidade de oxigénio presente nas misturas foi sempre inferior à existente no ar. De forma análoga, a concentração de saturação de azoto em água obtida nestes ensaios foi sempre superior à concentração de saturação de azoto em água, uma vez que nas misturas usadas a quantidade de azoto usada foi sempre superior à quantidade de azoto existente no ar.

Verificou-se ainda que a concentração de saturação de oxigénio obtida experimentalmente aumentou com o aumento da percentagem de oxigénio presente em cada mistura e que a concentração de saturação de azoto diminuiu com o aumento da percentagem de oxigénio.

4.1.2 Estudo da transferência de oxigénio em HSSL

O objectivo destes ensaios foi a determinação de parâmetros como a concentração de saturação de oxigénio em água, o coeficiente volumétrico de transferência de massa, k_La , e a taxa de transferência de oxigénio, OTR para diferentes condições operacionais. Nestes ensaios efectuados a 29 °C, forneceram-se ao sistema misturas de ar comprimido e azoto que correspondem às seguintes composições finais de oxigénio e de azoto: 1.05% O₂ e 98.95% N₂; 2.10% O₂ e 97.90% N₂ e por fim 4.20% O₂ e 95.80% N₂. Estudou-se também o efeito do caudal total de gás fornecido testando-se os valores de 100 mL/min e 200 mL/min ou 0.125 vvm e 0.250 vvm, respectivamente e o efeito da velocidade de rotação 100 rpm e 180 rpm. Na Tabela 6 apresentam-se os valores obtidos para o coeficiente volumétrico de transferência de massa, k_La , para a taxa de transferência de oxigénio, OTR e para a concentração de saturação de oxigénio, $C_{exp}^*(O_2)$ calculadas para as diferentes condições experimentais testadas. Apresentam-se ainda percentagens de oxigénio e de azoto fornecidas em cada condição experimental estudada.

Tabela 6 - Valores de k_La , OTR e $C_{exp}(O_2)$ obtidos em HSSL A 29 °C.

% O ₂ % N ₂	V _{rotação} (rpm)	100		180	
	Q _{total} (ml/min)	100	200	100	200
1.05 98.95	k_La (h ⁻¹)	5.28 ± 0.04	6.38 ± 0.05	8.79 ± 0.08	10.20 ± 0.08
	OTR (mmolO ₂ /Lh)	0.048 ± 3.79×10 ⁻⁴	0.064 ± 5.02×10 ⁻⁴	0.099 ± 9.75×10 ⁻⁴	0.118 ± 1.01×10 ⁻³
	$C_{exp}(O_2)$ (mmolO ₂ /L)	0.009	0.010	0.011	0.012
2.10 97.90	k_La (h ⁻¹)	4.73 ± 0.01	5.98 ± 0.02	7.48 ± 0.03	9.50 ± 0.04
	OTR (mmolO ₂ /Lh)	0.089 ± 3.70×10 ⁻⁴	0.118 ± 4.76×10 ⁻⁴	0.161 ± 7.61×10 ⁻⁴	0.208 ± 9.43×10 ⁻⁴
	$C_{exp}(O_2)$ (mmolO ₂ /L)	0.018	0.019	0.021	0.022
4.20 95.80	k_La (h ⁻¹)	2.98 ± 0.02	5.35 ± 0.01	5.68 ± 0.03	9.33 ± 0.06
	OTR (mmolO ₂ /Lh)	0.134 ± 1.08×10 ⁻³	0.249 ± 5.23×10 ⁻⁴	0.284 ± 1.67×10 ⁻³	0.493 ± 3.55×10 ⁻³
	$C_{exp}(O_2)$ (mmolO ₂ /L)	0.045	0.047	0.049	0.052

Os valores obtidos para o coeficiente volumétrico de transferência de massa, k_La , em função da percentagem de oxigénio apresentam-se na Figura 4.3.

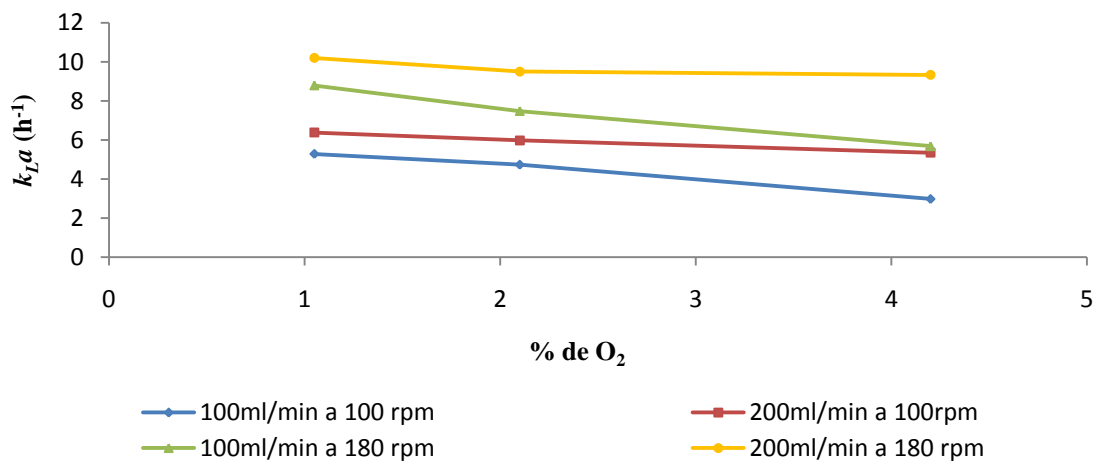


Figura 4.3 Variação dos valores de k_La em função da percentagem de oxigénio presente em cada ensaio experimental e para cada um dos caudais e velocidades de rotação testados.

De acordo com a Tabela 6 e a Figura 4.3 é possível observar que para a mesma percentagem de oxigénio mantendo o mesmo caudal total de gás à entrada do reactor, o coeficiente volumétrico de transferência de massa, k_La aumentou com a velocidade de rotação e mantendo a mesma velocidade de rotação, o coeficiente volumétrico de transferência de massa, k_La , aumentou

com o caudal total de gás à entrada do reator. Os resultados obtidos para os ensaios realizados em HSSL foram similares aos obtidos para a água. Tal como foi referido anteriormente, estes resultados eram esperados, uma vez que de acordo com García-Ochoa *et al* e Patel *et al* ^[50, 52] o coeficiente volumétrico de transferência de massa, k_La , aumenta com a velocidade de rotação e com o caudal total de gás à entrada do reator.

Os valores obtidos para a taxa de transferência de oxigénio, OTR , em função da percentagem de oxigénio apresentam-se na Figura 4.4.

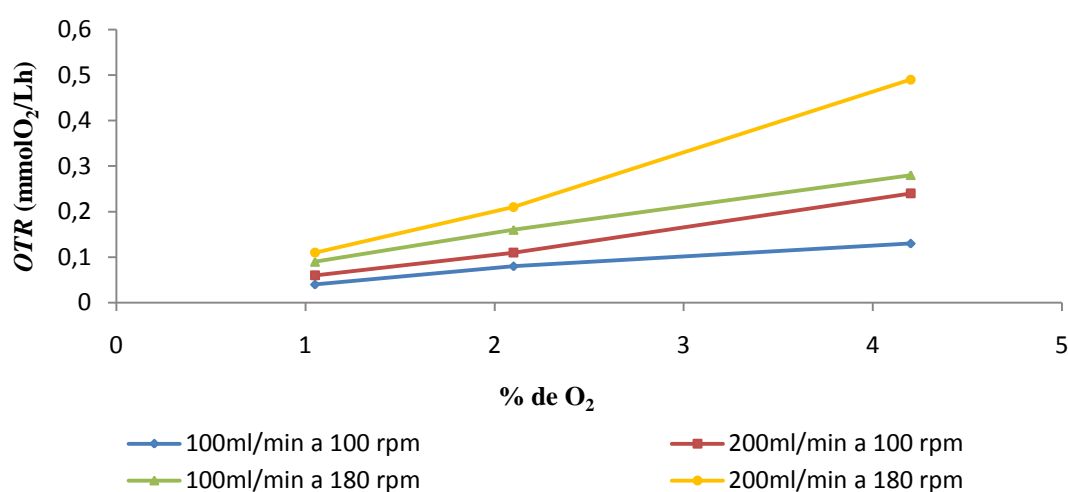


Figura 4.4 Variação dos valores de OTR em função da percentagem de oxigénio presente em cada ensaio experimental e para cada um dos caudais e velocidades de rotação testados.

De acordo com a Tabela 6 e a Figura 4.4 é possível observar que a taxa de transferência de oxigénio, OTR , aumentou com a velocidade de rotação, com o caudal total de gás à entrada do reator e com a percentagem de oxigénio presente na corrente gasosa. Os resultados obtidos para os ensaios realizados em HSSL foram similares aos obtidos para a água. De acordo com as conclusões obtidas por García-Ochoa *et al* e Patel *et al* ^[50, 52] era esperado que a taxa de transferência de oxigénio aumentasse com o aumento da velocidade de rotação e com o caudal total de gás à entrada do reator.

4.1.3 Ensaios Biológicos

4.1.3.1 Estudo da transferência de oxigénio em fermentações de *P. stipitis*

O objectivo destes ensaios foi a determinação de parâmetros como o coeficiente volumétrico de transferência de massa, k_La , a taxa de transferência de oxigénio, OTR a taxa de consumo de oxigénio, OUR e a taxa específica de consumo de oxigénio, qO_2 para os diferentes ensaios de fermentação pelo método dinâmico (*in situ*). Nestes ensaios efectuados a 29 °C, forneceram-se ao sistema misturas de ar comprimido e azoto que correspondem às seguintes composições finais de oxigénio e de azoto: 4.20% O_2 e 95.80% N_2 e 8.40% O_2 e 91.60% N_2 . Estudou-se também o efeito do caudal total de gás fornecido testando-se os valores de 100 mL/min e 200 mL/min ou 0.125 vvm e 0.250 vvm, respectivamente, mantendo a velocidade de rotação constante a 180 rpm.

A partir dos dados experimentais, determinaram-se os valores do coeficiente volumétrico de transferência de massa, k_La , da taxa de transferência de oxigénio, OTR , da taxa de consumo de oxigénio, OUR e da taxa específica de consumo de oxigénio, qO_2 pelo método dinâmico. Estes parâmetros foram todos determinados após cerca 2 horas de fermentação, ou seja, durante a fase *lag*. Os resultados obtidos apresentam-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Valores de OTR , OUR , k_La e qO_2 obtidos para as fermentações.

Fermentação	Q_{total} (ml/min)	% O_2 % N_2	OTR (mmol O_2 /Lh)	k_La (h ⁻¹)	OUR (mmol O_2 /Lh)	qO_2 (mmol O_2 /gh)
I	200	8.40 91.60	1.189 ± 0.039	18.71 ± 0.53	$0.179 \pm 1.530 \times 10^{-3}$	$0.781 \pm 6.658 \times 10^{-3}$
II	200	4.20 95.80	0.333 ± 0.011	9.24 ± 0.32	$0.091 \pm 1.088 \times 10^{-3}$	$0.357 \pm 4.265 \times 10^{-3}$
III	100	8.40 91.60	0.495 ± 0.111	6.67 ± 1.40	$0.118 \pm 1.303 \times 10^{-3}$	$0.391 \pm 4.314 \times 10^{-3}$

De acordo com os valores apresentados na Tabela 7, comparando as fermentações I e II é possível observar que para um mesmo caudal total de gás de 200 mL/min, o aumento da percentagem de oxigénio, originou um aumento do coeficiente volumétrico de transferência de massa, k_La , que correspondeu a um aumento da taxa de transferência de oxigénio, OTR . Obteve-se

uma taxa de consumo de oxigénio, OUR , superior na fermentação I, uma vez que uma maior quantidade de oxigénio disponível, origina uma maior taxa de consumo de oxigénio e por sua vez uma maior taxa específica de consumo de oxigénio, qO_2 . De acordo com García – Ochoa *et al* ^[54], a taxa de consumo de oxigénio, OUR , aumenta com a quantidade de oxigénio, confirmando os resultados obtidos nestes ensaios. Comparando as fermentações I e III é possível observar que para a mesma quantidade de oxigénio disponível, 8.40%, OTR , k_La , OUR e qO_2 aumentaram com o aumento do caudal total de gás.

Foram realizados quatro ensaios biológicos, contudo não são apresentados valores de OTR , k_La , OUR e qO_2 para a fermentação IV uma vez que após a inoculação de *P. stipitis*, o valor de oxigénio dissolvido era muito baixo, cerca de 0.6 mg/L não tendo sido possível realizar-se o método dinâmico, impossibilitando assim o cálculo dos parâmetros acima descritos.

4.1.3.2 Fermentação I

Nesta fermentação forneceu-se uma mistura de ar comprimido e azoto que correspondem às seguintes composições finais de oxigénio e de azoto: 8.40% O_2 e 91.60% N_2 . Estudou-se também o efeito do caudal total de gás fornecido testando-se o valor de 200 mL/min mantendo a velocidade de rotação constante a 180 rpm. Na Figura 4.5 são apresentados os resultados obtidos para a fermentação I.

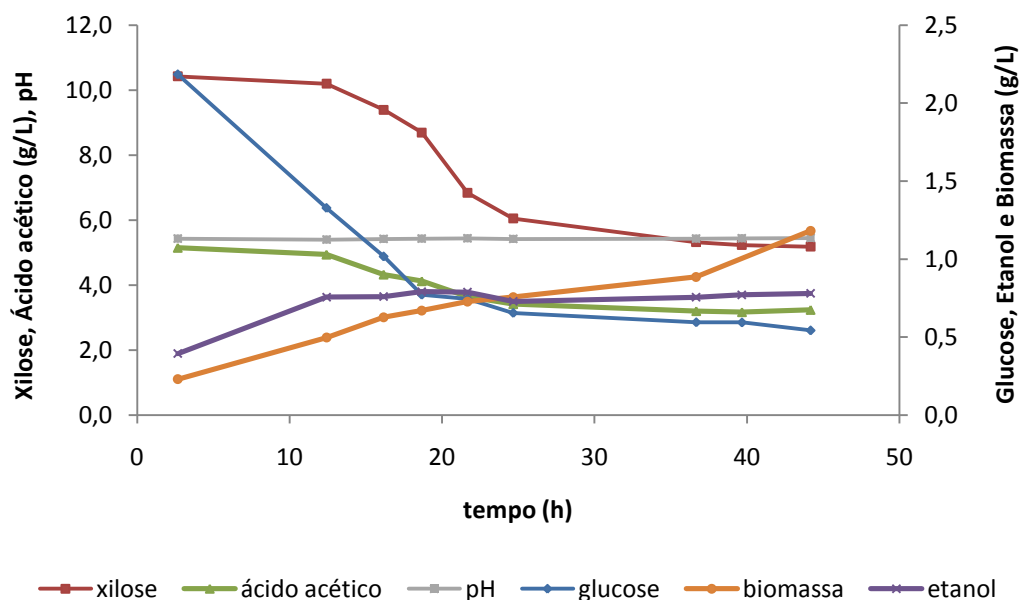


Figura 4.5 Evolução do perfil de concentrações de xilose, glucose, ácido acético, etanol, biomassa e pH durante a fermentação I.

Observando a Figura 4.5, verifica-se que a xilose começou a ser consumida a partir das 12 horas até as 25 horas de fermentação quando a sua concentração atingiu as 5 g/L. Foram consumidas cerca de 1.5 g/L de glucose nas primeiras 20 horas de fermentação. É também neste momento, 20 horas de fermentação, que se atinge a concentração máxima de etanol, cerca de 0.79 g/L. A partir deste momento, a concentração de etanol foi diminuindo ao longo do tempo, possivelmente devido a fenómenos de evaporação e/ou oxidação. A biomassa aumentou gradualmente ao longo do tempo, atingindo-se um valor de 1.18 g/L, que correspondeu a uma taxa específica de crescimento de $\mu = 0.033 \text{ h}^{-1}$. Verificou-se ainda que ocorreu consumo de ácido acético durante as primeiras 20 horas de fermentação, estagnando por volta das 3 g/L. O pH do meio manteve-se constante em aproximadamente 5.5.

4.1.3.3 Fermentação II

Nesta fermentação foi fornecida uma mistura de ar comprimido e azoto que correspondem às seguintes composições finais de oxigénio e de azoto: 4.20% O_2 e 95.80% N_2 . Estudou-se também o efeito do caudal total de gás fornecido testando-se o valor de 200 mL/min mantendo a velocidade de rotação constante a 180 rpm. Na Figura 4.6 são apresentados os resultados obtidos para a fermentação II.

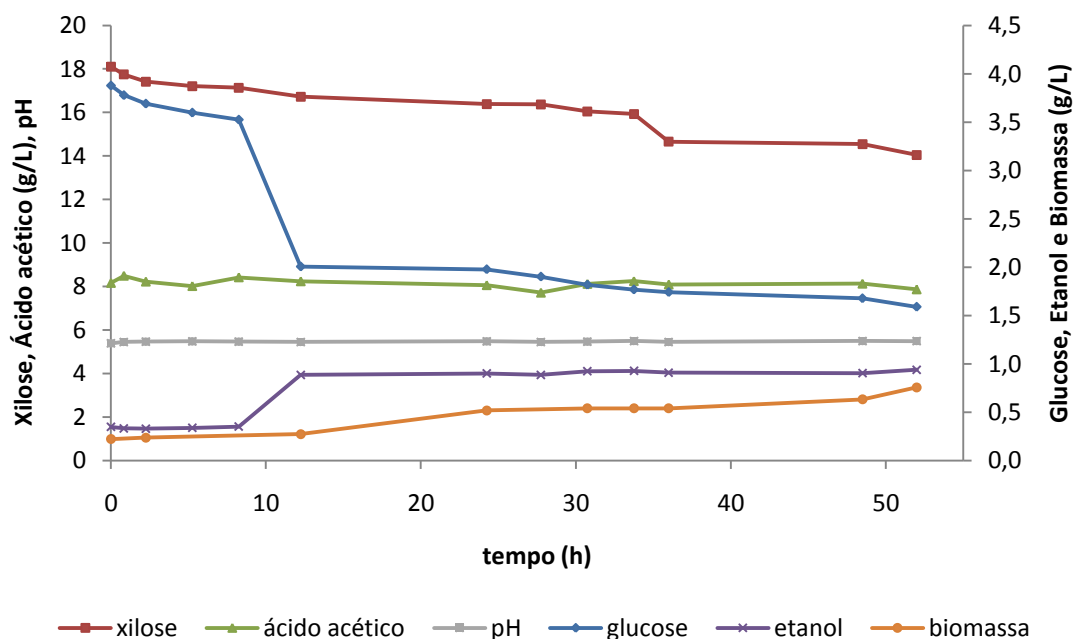


Figura 4.6 Evolução do perfil de concentrações de xilose, glucose, ácido acético, etanol, biomassa e pH durante a fermentação II.

Observando a Figura 4.6, verifica-se que o consumo da xilose foi muito lento, tendo apenas sido consumidas cerca de 4 g/L durante toda a fermentação. A glucose começa a ser consumida desde o início da fermentação, sendo o seu consumo mais acentuado a partir das 8 horas de fermentação. Foram consumidas cerca de 2 g/L de glucose em 52 horas de fermentação. Associado a este consumo de glucose observou-se o aumento da concentração de etanol, obtendo-se cerca de 0,88 g/L ao fim de 12 horas de fermentação. A partir deste instante, a concentração de etanol manteve-se constante a 0.90 g/L. A biomassa aumentou gradualmente ao longo do tempo, atingindo um valor de 0.75 g/L, que correspondeu a uma taxa específica de crescimento de $\mu = 0.011 \text{ h}^{-1}$. Porém o seu crescimento não foi significativo, uma vez que nesta fermentação, a *P. stipitis* desviou o seu metabolismo e optou por fermentar a glucose disponível a etanol em detrimento da multiplicação celular. O baixo consumo de xilose nesta fermentação pode ser explicado uma vez que a fermentação da xilose por *P. stipitis* é inibida pela presença de ácido acético.^[55] Com concentrações de ácido acético acima das 7 g/L, *P. stipitis* não consegue fermentar a xilose.^[56] O pH do meio manteve-se constante em aproximadamente 5.5.

4.1.3.4 Fermentação III

A esta fermentação foi fornecida uma mistura de ar comprimido e azoto que correspondem às seguintes composições finais de oxigénio e de azoto: 8.40% O₂ e 91.60% N₂. Estudou-se também o efeito do caudal total de gás fornecido testando-se o valor de 100 mL/min mantendo a velocidade de rotação constante a 180 rpm. Na Figura 4.7 são apresentados os resultados obtidos para a fermentação III.

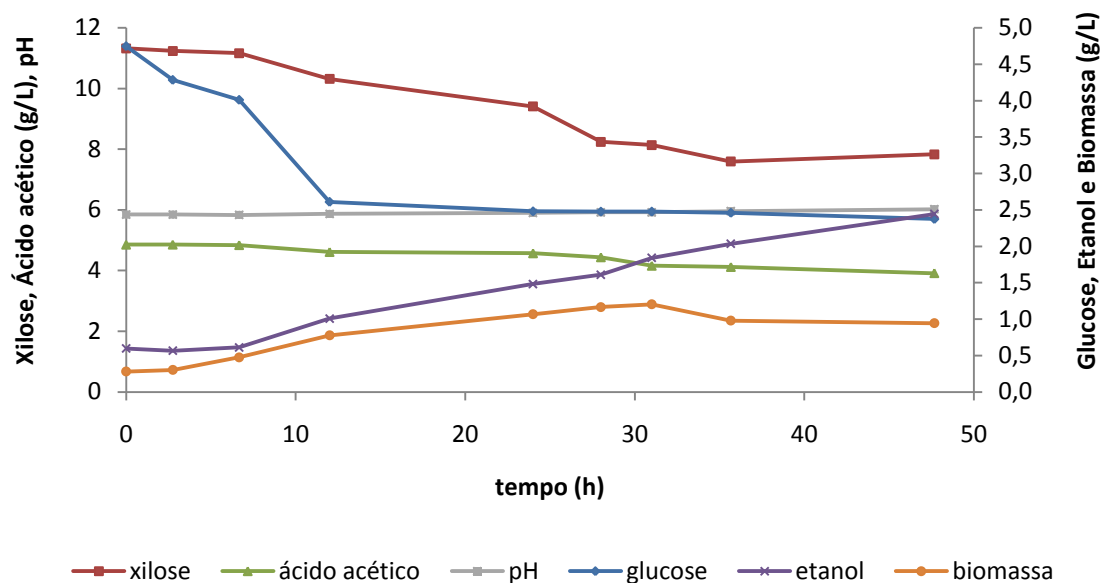


Figura 4.7 Evolução do perfil de concentrações de xilose, glucose, ácido acético, etanol, biomassa e pH durante a fermentação III.

Observando a Figura 4.7, verifica-se que a glucose foi consumida em detrimento da xilose nas primeiras 12 horas de fermentação, a partir deste instante a levedura passa a consumir a xilose até ao fim da fermentação e a concentração de glucose manteve-se constante, cerca de 2,5 g/L. Nesta fermentação, o consumo de ácido acético não foi significativo, mantendo-se sempre uma concentração de cerca de 4 g/L. A produção de etanol aumentou a partir das 8 horas de fermentação, obtendo-se uma concentração máxima de etanol de 2,44 g/L após 48 horas de fermentação. Observou-se um aumento na concentração de biomassa até às 30 horas de fermentação, atingindo-se um valor de 1,20 g/L e diminuindo até ao fim da fermentação, correspondendo a uma taxa específica de crescimento de $\mu = 0,044 \text{ h}^{-1}$. Esta diminuição pode ser justificada pela acumulação de biomassa na parte superior da parede do reactor, zona onde não existe contacto com o meio reaccional. À semelhança do que ocorreu na fermentação anterior, *P. stipitis* desviou o seu metabolismo e optou por fermentar a xilose disponível a etanol em detrimento da multiplicação celular. O pH do meio manteve-se constante em aproximadamente 5,9.

4.1.3.5 Fermentação IV

A esta fermentação foi fornecida uma mistura de ar comprimido e azoto que correspondem às seguintes composições finais de oxigénio e de azoto: 4.20% O₂ e 95.80% N₂. Estudou-se também o efeito do caudal total de gás fornecido testando-se o valor de 100 mL/min mantendo a velocidade de rotação constante a 180 rpm. Na Figura 4.8 são apresentados os resultados obtidos para a fermentação IV.

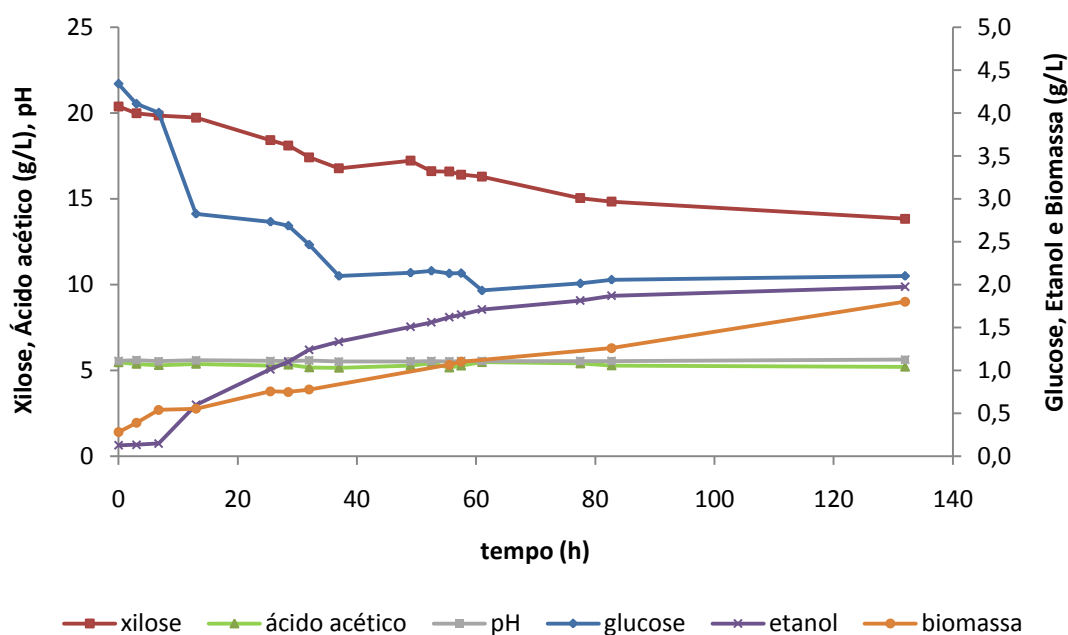


Figura 4.8 Evolução do perfil de concentrações de xilose, glucose, ácido acético, etanol, biomassa e pH durante a fermentação IV.

Observando a Figura 4.8, verifica-se que até às 40 horas de fermentação a glucose foi consumida em detrimento da xilose, tendo sido consumido cerca de 2 g/L. A xilose começa a ser consumida de uma forma mais acentuada a partir das 40 horas de fermentação, consumindo-se cerca de 6.5 g/L durante 132 horas. A concentração de etanol aumentou ao longo do tempo, atingindo um valor máximo de 1.97 g/L ao fim de 132 horas de fermentação. A biomassa aumentou gradualmente ao longo do tempo, atingindo um valor de 1.80 g/L que correspondeu a uma taxa específica de crescimento de $\mu = 0.006 \text{ h}^{-1}$. Mais uma vez se observa que a *P. stipitis* optou pelo metabolismo fermentativo em detrimento do crescimento celular. A concentração de ácido acético manteve-se constante ao longo da fermentação, cerca de 5 g/L. O pH do meio manteve-se constante em aproximadamente 5.6.

Os resultados obtidos nas fermentações são apresentados na Tabela 8. As taxas de consumo de substrato, r_s , de produção de produto, r_p , e produção de biomassa, r_x , foram calculadas para o instante em que se obteve a concentração máxima de etanol.

Tabela 8 - Tabela resumo das fermentações.

Parâmetros	Fermentações			
	I	II	III	IV
Q_{total} (mL/min)	200		100	
% O ₂	8.40	4.20	8.40	4.20
% N ₂	91.60	95.80	91.60	95.80
μ (h ⁻¹)	0.033	0.011	0.044	0.006
r_s (g/L.h)	0.261	0.128	0.143	0.077
r_p (g/L.h)	0.025	0.011	0.039	0.014
r_x (g/L.h)	0.027	0.010	0.014	0.012
$Y_{(p/s)}$ (g _{et} /g _{sub})	0.095	0.089	0.271	0.183
$Y_{(x/s)}$ (g _{bio} /g _{sub})	0.105	0.080	0.097	0.157
$Y_{(p/x)}$ (g _{et} /g _{bio})	0.903	1.109	2.783	1.161
Concentração máxima de etanol (g/L)	0.791	0.939	2.442	1.974
Concentração máxima de biomassa (g/L)	1.182	0.756	0.944	1.801
Tempo total de fermentação (h)	44	52	48	132

Observando os valores da Tabela 8, verificou-se que comparando as fermentações I e II, para o caudal de 200 mL/min, os valores obtidos para as taxas de consumo de substrato e taxas de produção de etanol e biomassa na fermentação II foram todos inferiores aos obtidos para a fermentação I, uma vez que esta possui uma menor percentagem de oxigénio. Na fermentação I, foi consumida uma maior quantidade de substrato, produziu-se uma maior quantidade de biomassa e de etanol do que na fermentação II. Contudo, obteve-se um rendimento de produção de etanol superior na fermentação I, relativamente à fermentação II, uma vez que a levedura optou por um metabolismo fermentativo em detrimento do metabolismo de multiplicação celular.

Comparando as fermentações III e IV, verificou-se que para um caudal de 100 mL/min, os valores obtidos para as taxas de consumo de substrato e taxas de produção de etanol e biomassa na fermentação IV foram todos inferiores aos obtidos para a fermentação III, uma vez que esta possui

uma menor percentagem de oxigénio. Na fermentação IV, o consumo de substrato, a taxa de produção de etanol e a taxa de produção de biomassa foram menores, relativamente à fermentação III, obtendo-se uma concentração de biomassa e um rendimento de produção de biomassa superior na fermentação IV. A fermentação que apresenta melhores resultados é a fermentação III, pois foi onde se obteve o valor mais elevado de concentração de etanol, cerca de 2.44 g/L, um valor de rendimento de produção de etanol mais elevado, $0.27 \text{ g}_{\text{et}}/\text{g}_{\text{sub}}$, para um tempo de fermentação menor, usando um caudal volumétrico total de gás menor (100 mL/min). Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Silva *et al* ^[57] que usando como microrganismo *P. stipitis* e como substrato um meio rico em xilose, obteve concentrações máximas de etanol nos ensaios onde o caudal total de gás era menor. Relacionando estes resultados com os obtidos na Tabela 7, é possível dizer que um aumento da taxa de transferência de oxigénio, favorece a produção de biomassa, tendo sido produzido 1.18 g/L de biomassa com um k_La de 18.71 h^{-1} . A concentração máxima de etanol obtida foi de 2.44 g/L com um k_La de 6.67 h^{-1} . Resultados semelhantes foram observados por Telli-Okur *et al* ^[58], que usando o mesmo microrganismo, a *P. stipitis*, obteve uma maior concentração celular na fermentação onde a taxa de transferência de oxigénio foi superior. De acordo com Klinner *et al* ^[31] que no seu estudo utilizou como microrganismo a levedura *P. stipitis* num meio de cultura rico em glucose, uma quantidade elevada de oxigénio pode levar a baixas concentrações de etanol. Este facto vem de encontro aos resultados obtidos neste trabalho, uma vez que a menor concentração de etanol, cerca de 0.79 g/L, foi obtida na fermentação I que dispunha de uma concentração de oxigénio superior, 8.40%, num caudal de gás total superior, 200 mL/min.

De acordo com Liu *et al* ^[59], o rendimento de etanol obtido é praticamente constante para valores de k_La inferiores a 14 h^{-1} . O valor de k_La deve estar entre 0 e 14 h^{-1} para que se obtenha um rendimento de etanol maior.

5 Conclusões

O presente trabalho teve como objectivo principal o estudo da influência do oxigénio em fermentações de HSSL por *Pichia stipitis* para a produção de bioetanol. Para isso realizaram-se ensaios de transferência de oxigénio em água, em HSSL e finalmente em fermentações de HSSL. Com estes ensaios, foi possível concluir que a taxa de transferência de oxigénio, OTR , aumenta com a velocidade de rotação, com o caudal total de gás à entrada do reactor e com a percentagem de oxigénio presente na corrente gasosa. Para a mesma percentagem de oxigénio mantendo o mesmo caudal total de gás à entrada do reactor, o coeficiente volumétrico de transferência de massa, k_La aumenta com a velocidade de rotação. Por outro lado, mantendo a mesma velocidade de rotação, o coeficiente volumétrico de transferência de massa, k_La aumenta com o caudal total de gás à entrada do reactor.

Para os ensaios realizados em água, foram calculadas as concentrações de saturação de oxigénio e azoto teóricas pela lei de Henry, sendo possível depois relacioná-las com as concentrações de saturação obtidas experimentalmente. De acordo com a lei de Henry é possível constatar que para uma mistura com uma pressão parcial de oxigénio inferior à pressão parcial de oxigénio no ar, obtém-se uma fracção molar de equilíbrio de oxigénio dissolvido inferior e por consequência uma concentração de saturação de oxigénio inferior. Do mesmo modo, com uma pressão parcial de azoto superior à pressão parcial de azoto no ar, obtém-se uma fracção molar de equilíbrio de azoto dissolvido superior e por consequência uma concentração de saturação de azoto superior. ^[53]

A concentração de saturação de oxigénio em água nunca é atingida nestes ensaios, uma vez que a quantidade de oxigénio presente nas misturas é sempre inferior à existente no ar. De forma análoga, a concentração de saturação de azoto em água obtida nestes ensaios é sempre superior à concentração de saturação de azoto em água, uma vez que nas misturas testadas a quantidade de azoto usada foi sempre superior à quantidade de azoto existente no ar. Observa-se também que a concentração de saturação de oxigénio, obtida experimentalmente, aumenta com o aumento da percentagem de oxigénio presente em cada mistura e que a concentração de saturação de azoto diminui com o aumento da percentagem de oxigénio na mistura.

Na segunda parte do trabalho, realizaram-se ensaios biológicos tendo como objectivo o estudo de difusão de oxigénio na presença de *P. stipitis*. Com estes ensaios obtiveram-se resultados semelhantes aos obtidos para os ensaios com água e HSSL, relativamente ao coeficiente volumétrico de transferência de massa, k_La e a taxa de transferência de oxigénio, OTR . Foi possível determinar a taxa de consumo de oxigénio, OUR e a taxa específica de consumo de oxigénio, qO_2 . Com os resultados obtidos, concluiu-se que uma maior quantidade de oxigénio disponível origina

uma maior taxa de consumo de oxigénio, OUR e por sua vez uma maior taxa específica de consumo de oxigénio, qO_2 .

Nestes ensaios monitorizou-se o crescimento de biomassa, a produção de etanol e os consumos de glucose, xilose e ácido acético por parte da *P. stipitis*. Para cada uma das fermentações, foram calculadas a taxa específica de crescimento, μ , a taxa de consumo de substrato, r_s , a taxa de produção de produto, r_p , e a taxa de produção de biomassa, r_x . Com os resultados obtidos conclui-se que para um mesmo caudal total de gás à entrada do reactor, a taxa específica de crescimento, a taxa de consumo de substrato, a taxa de produção de produto e a taxa de produção de biomassa aumentam com o aumento da percentagem de oxigénio presente na corrente gasosa.

A fermentação na qual se obteve um valor mais elevado de biomassa foi a fermentação IV, que dispunha de 4.20% de oxigénio em 100 mL/min, obtendo-se um valor de 1.80 g/L. Relativamente à concentração de etanol, a fermentação onde se obteve um valor mais elevado foi na fermentação III, que dispunha de 8.40% de oxigénio em 100 mL/min, obtendo-se um valor de 2.44 g/L. Conclui-se portanto que a fermentação que apresenta melhores resultados é a fermentação III, pois foi onde se obteve o valor mais elevado de concentração de etanol e um valor de rendimento de produção de etanol mais elevado, para um tempo de fermentação menor, usando um caudal volumétrico total de gás menor.

Conclui-se também que um aumento da taxa de transferência de oxigénio favorece a produção de biomassa, produzindo-se 1.18 g/L com um k_La de 18.71 h⁻¹ na fermentação I. A concentração máxima de etanol obtida foi de 2.44 g/L com um k_La de 6.67 h⁻¹ na fermentação III.

6 Bibliografia

1. Agbogbo, F.K. e Coward, K.G., *Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, Pichia Stipitis*. Biotechnology Letters, 2009. **30**(9): p. 1515-1524.
2. Zaldivar, J., Nielsen, J. e Olsson, L., *Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001. **56**(1-2): p. 17-34.
3. Agbogbo, F.K., Coward, K.G., Torry-Smith, M. e Wenger, K.S., *Fermentation of glucose/xylose mixtures using Pichia stipitis*. Process Biochemistry, 2006. **41**(11): p. 2333-2336.
4. Gray, K.A., Zhao, L. e Emptage, M., *Bioethanol*. Current Opinion in Chemical Biology, 2006. **10**(2): p. 141-146.
5. Zhang, Y.H.P., *Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2008. **35**(5): p. 367-375.
6. Demirbas, A., *Progress and recent trends in biofuels*. Progress in Energy and Combustion Science, 2007. **33**(1): p. 1-18.
7. Xavier, A.M.R.B., Correia, M.F., Pereira, S.R. e Evtuguin, D.V., *Second-generation bioethanol from eucalypt sulphite spent liquor*. Bioresource Technology, 2010. **101**(8): p. 2755-2761.
8. Sánchez, Ó.J. e Cardona, C.A., *Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks*. Bioresource Technology, 2008. **99**(13): p. 5270-5295.
9. Chirat, ed. *Biofuels for Transport: An International Perspective*. 2004, International Energy Agency: Paris.
10. Disponível em: <http://www.agra-net.com/> Acedido em: Maio 2011;
11. Cardona, C.A. e Sánchez, Ó.J., *Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities*. Bioresource Technology, 2007. **98**(12): p. 2415-2457.
12. Balat, M., Balat, H. e Öz, C., *Progress in bioethanol processing*. Progress in Energy and Combustion Science, 2008. **34**(5): p. 551-573.
13. González-García, S., Gasol, C.M., Gabarrell, X., Rieradevall, J., Moreira, M.T. e Feijoo, G., *Environmental aspects of ethanol-based fuels from Brassica carinata: A case study of second generation ethanol*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2009. **13**(9): p. 2613-2620.

14. Mussatto, S.I., Dragone, G., Guimarães, P.M.R., Silva, J.P.A., Carneiro, L.M., Roberto, I.C., Vicente, A., Domingues, L. e Teixeira, J.A., *Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production*. Biotechnology Advances, 2010. **28**(6): p. 817-830.
15. Balat, M., *Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review*. Energy Conversion and Management, 2011. **52**(2): p. 858-875.
16. Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M. e Negro, M.J., *Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review*. Bioresource Technology, 2010. **101**(13): p. 4851-4861.
17. Demirbas, A., *Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass*. Energy Sources, 2005. **27**(4): p. 327-337.
18. Sixta, H., Potthast, A. e Krottschek, A.W., *Handbook of Pulp*, ed. Sixta, H. Vol. 1. 2006, Weinheim: Wiley-VCH. 427-430.
19. Disponível em: <http://www.ecy.wa.gov/programs/air/pdfs/pulpmil3.pdf>. Washington State Department of Ecology. Acedido em: Janeiro 2011;
20. Correia, M.F., *Produção de bioetanol a partir do licor de cozimento ao sulfito ácido*, in *Departamento de Química*. 2008, Universidade de Aveiro: Aveiro.
21. Biermann, C.J., *Handbook of Pulping and Papermaking*. 1996: Elsevier Science & Technology Books. 91-96.
22. Kirk, R.E. e Othmer, D.V., *Encyclopedia of Chemical Technology*. 4º ed. Vol. 20. 1985: John Wiley & Sons. 87-91.
23. Sjöström, E., *Wood Chemistry: Fundamentals and Applications*. 2 ed. 1993, San Diego: Academic Press. 114-131.
24. Marques, A.P., Evtuguin, D.V., Magina, S., Amado, F.M.L. e Prates, A., *Chemical Composition of Spent Liquors from Acidic Magnesium-Based Sulphite Pulping of Eucalyptus globulus*. Journal of Wood Chemistry & Technology, 2009. **29**(4): p. 322-336.
25. Bjørsvik, H.-R. e Liguori, L., *Organic Processes to Pharmaceutical Chemicals Based on Fine Chemicals from Lignosulfonates*. Organic Process Research & Development, 2002. **6**(3): p. 279-290.
26. Plank, J., *Applications of biopolymers and other biotechnological products in building materials*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004. **66**(1): p. 1-9.
27. Nigam, J.N., *Ethanol production from hardwood spent sulfite liquor using an adapted strain of Pichia stipitis*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2001. **26**(3): p. 145-150.

28. Madigan, M.T., Martinko, J.M. e Parker, J., *Biology of Microorganisms*. 8 ed. 1997, Londres: Prentice-Hall International. 147-150; 736-738.
29. Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockley, J.S. e Higton, G., *Industrial Microbiology: An introduction*, ed. Wiley-Blackwell. 2001.
30. Disponível em: <http://genome.jgi-psf.org/Picst3/Picst3.home.html> Acedido em: Setembro 2009;
31. Klinner, U., Fluthgraf, S., Freese, S. e Passoth, V., *Aerobic induction of respiro-fermentative growth by decreasing oxygen tensions in the respiratory yeast Pichia stipitis*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005. **67**(2): p. 247-253.
32. Jeffries, T.W. e Jin, Y.S., *Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts*. Applied Microbiology & Biotechnology, 2004. **63**(5): p. 495-509.
33. du Preez, J.C., *Process parameters and environmental factors affecting -xylose fermentation by yeasts*. Enzyme and Microbial Technology, 1994. **16**(11): p. 944-956.
34. Slininger, P., Dien, B., Gorsich, S. e Liu, Z., *Nitrogen source and mineral optimization enhance d-xylose conversion to ethanol by the yeast Pichia stipitis NRRL Y-7124*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006. **72**(6): p. 1285-1296.
35. Disponível em: <http://biologiaconcursos.blogspot.com/2010/05/fermentacao-alccolica.html> Acedido em: Junho 2011;
36. Chandrakant, P. e Bisaria, V.S., *Simultaneous Bioconversion of Cellulose and Hemicellulose to Ethanol*. Critical Reviews in Biotechnology, 1998. **18**(4): p. 295 - 331.
37. Jeppsson, M., Bengtsson, O., Franke, K., Lee, H., Hahn-Hägerdal, B. e Gorwa-Grauslund, M.F., *The expression of a Pichia stipitis xylose reductase mutant with higher K_M for NADPH increases ethanol production from xylose in recombinant Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering, 2006. **93**(4): p. 665-673.
38. Chu, B.C.H. e Lee, H., *Genetic improvement of Saccharomyces cerevisiae for xylose fermentation*. Biotechnology Advances. **25**(5): p. 425-441.
39. Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I. e Gorwa-Grauslund, M., *Towards industrial pentose-fermenting yeast strains*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007. **74**(5): p. 937-953.
40. Matsushika, A., Inoue, H., Kodaki, T. e Sawayama, S., *Ethanol production from xylose in engineered <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains: current state and perspectives*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009. **84**(1): p. 37-53.
41. Huang, C.-F., Lin, T.-H., Guo, G.-L. e Hwang, W.-S., *Enhanced ethanol production by fermentation of rice straw hydrolysate without detoxification using a newly adapted strain of Pichia stipitis*. Bioresource Technology, 2009. **100**(17): p. 3914-3920.

-
42. Bajwa, P.K., Shireen, T., D'Aoust, F., Pinel, D., Martin, V.J., Trevors, J.T. e Lee, H., *Mutants of the pentose-fermenting yeast Pichia stipitis with improved tolerance to inhibitors in hardwood spent sulfite liquor*. Biotechnology and Bioengineering, 2009. **104**(5): p. 892-900.
 43. Teixeira, J.A. e Fonseca, M.M., *Reactores Biológicos, Fundamentos e Aplicações*, ed. Lidel. 2007.
 44. Hines, A.L. e Maddox, R.N., *Mass Transfer Fundamentals and Applications*, ed. International, P.-H. 1985.
 45. Treybal, R.E., *Mass Transfer Operations*. 3 ed, ed. McGraw-Hill, I. 1980.
 46. Bailey, J.E. e Ollis, O.F., *Transport phenomena in microbial systems*. Biochemical Engineering Fundamentals, ed. MacGraw-Hill. 1986, New York. 411-495.
 47. Atkinson, B. e Mavituna, F., *Gas-liquid mass transfer*. The nature Press, ed. handbook, B.e.a.b. 1983, New York. 727-802.
 48. Perry, R.H. e Green, D.W., *Perry's Chemical Engineers' Handbook*. 8 ed. 2007, New York: McGraw-Hill. 2.130.
 49. Ratledge, C. e Kristiansen, B., *Basic Biotechnology*. 3 ed. 2006, Cambridge: Cambridge University Press. 206-208.
 50. García-Ochoa, F., Castro, E.G. e Santos, V.E., *Oxygen transfer and uptake rates during xanthan gum production*. Enzyme and Microbial Technology, 2000. **27**(9): p. 680-690.
 51. García-Ochoa, F. e Castro, E.G., *Prediction of Gas-Liquid Mass Transfer Coefficient in Sparged Stirred Tank Bioreactors*. Biotechnology and Bioengineering, 2005. **92**(6): p. 761-772.
 52. Patel, N. e Thibault, J., *Enhanced in situ dynamic method for measuring K_{La} in fermentation media*. Biochemical Engineering Journal, 2009. **47**(1-3): p. 48-54.
 53. Atkins, P.W., *Physical Chemistry*. 6 ed. 1998, Oxford: Oxford University Press. 173-176.
 54. Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., Santos, V.E. e Merchuk, J.C., *Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview*. Biochemical Engineering Journal, 2010. **49**(3): p. 289-307.
 55. Scordia, D., Cosentino, S.L. e Jeffries, T.W., *Second generation bioethanol production from Saccharum spontaneum L. ssp. aegyptiacum (Willd.) Hack*. Bioresource Technology, 2010. **101**(14): p. 5358-5365.
 56. Jeffries, T.W., *Engineering the Pichia stipitis genome for fermentation of hemicellulose hydrolysates*. Bioenergy ed. Wall, J.D., Harwood, C.S. e Demain, A.L. 2008, Washington DC: American Society for Microbiology. 37-47.

57. Silva, J.P.A., Mussatto, S.I., Roberto, I.C. e Teixeira, J.A., *Ethanol production from xylose by Pichia stipitis NRRL Y-7124 in a stirred tank bioreactor*. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2011. **28**: p. 151-156.
58. Telli-Okur, M. e Eken-Saraçoglu, N., *Fermentation of sunflower seed hull hydrolysate to ethanol by Pichia stipitis*. Bioresource Technology, 2008. **99**(7): p. 2162-2169.
59. Liu, H.S., Chou, C.M. e Lee, Y.C., *The effect of kLa on the ethanol yield for xylose fermentation*. Journal of Chinese Institute of Chemical Engineers, 2002. **33**: p. 161-166.

7 ANEXOS

7.1 ANEXO 1 – Curvas de Calibração

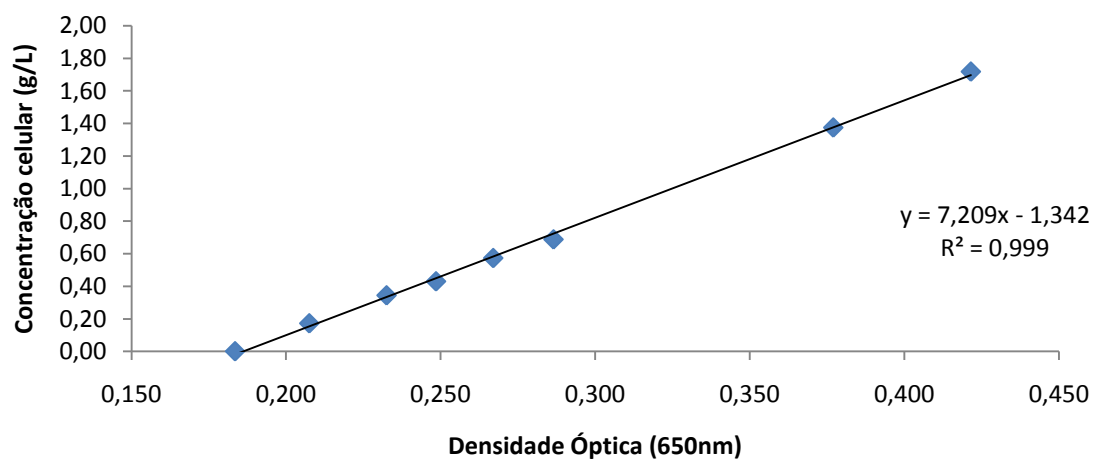


Figura 7.1 Curva de calibração obtida entre o peso seco e a densidade óptica a 650nm de *P. stipitis*

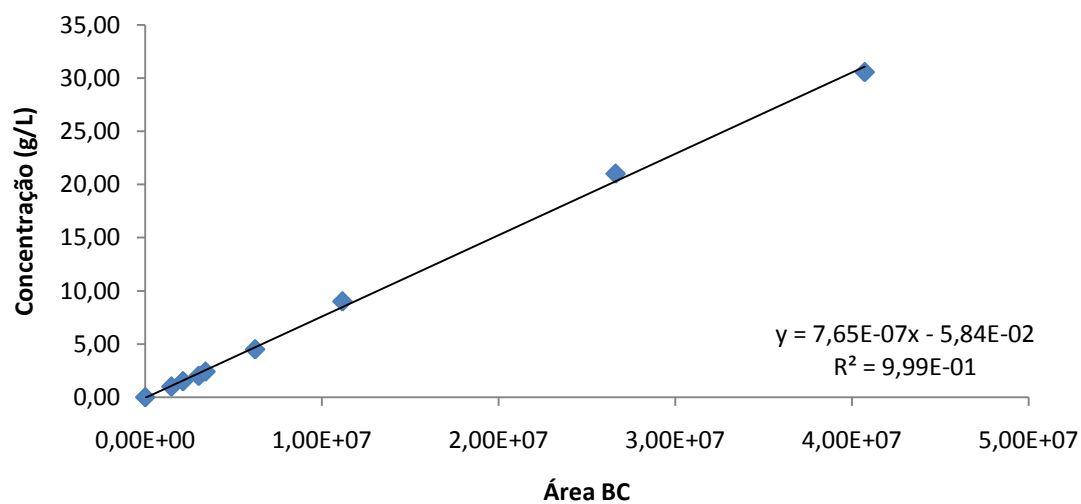


Figura 7.2 Curva de calibração da glucose (HPLC)

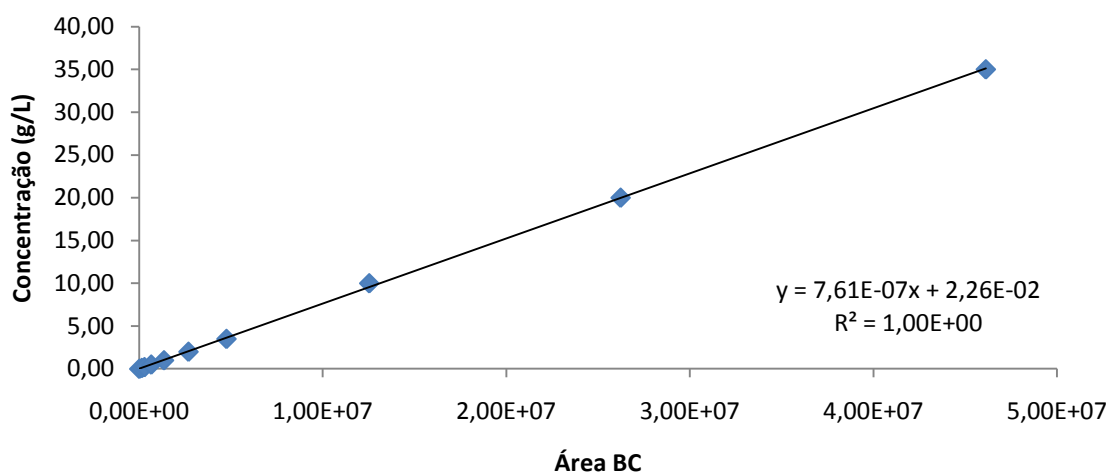


Figura 7.3 Curva de calibração da xilose (HPLC)

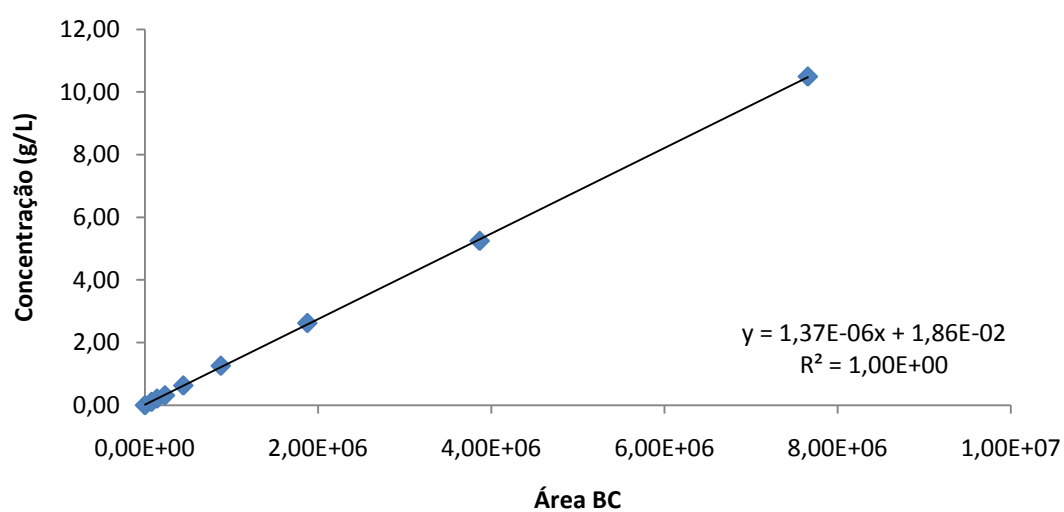


Figura 7.4 Curva de calibração do ácido acético (HPLC)

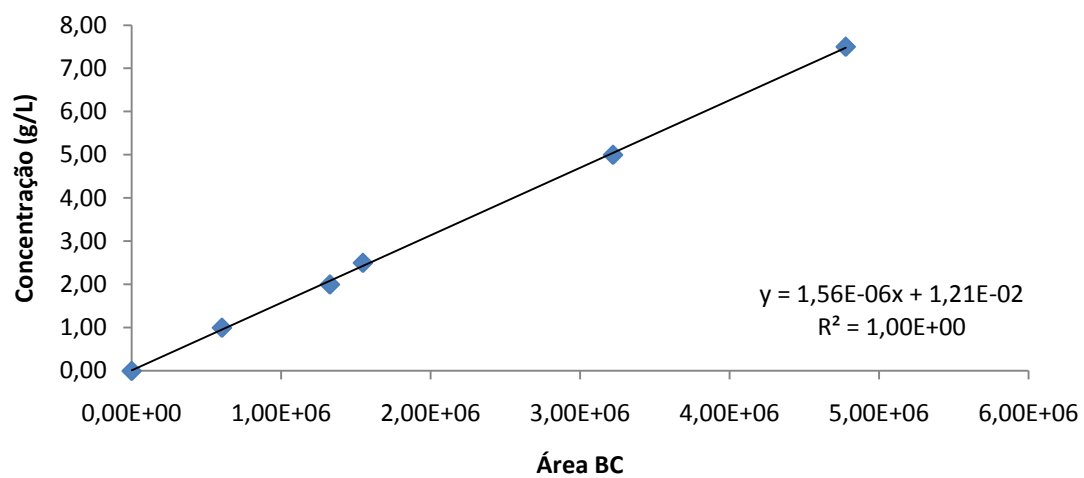


Figura 7.5 Curva de calibração do etanol (HPLC)